

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
20. Februar 2003 (20.02.2003)

PCT

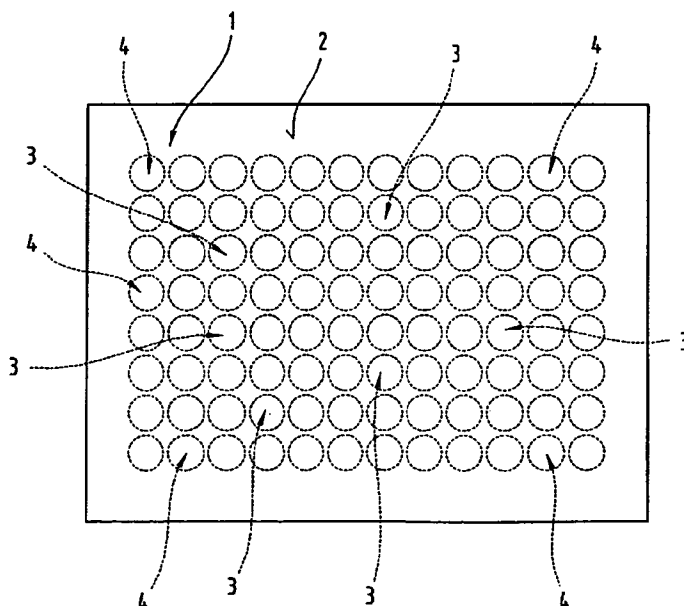
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/014382 A2**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12Q 1/68, B01J 19/00
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT02/00239
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
8. August 2002 (08.08.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
A 1247/2001 9: August 2001 (09.08.2001) AT
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): LAMBDA LABOR FÜR MOLEKULAR-BIOLOGISCHE [AT/AT]; DNA-Analysen GmbH, Industriestrasse 6, A-4240 Freistadt (AT).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MITTERMAYR, Christian, Rudolf [AT/AT]; Schneiderweg 1, A-4111 Walding (AT). RONACHER, Bernhard [AT/AT]; Makartstrasse 13, A-4020 Linz (AT). WINNER, Florian [AT/AT]; Wimmerfeld 3, A-4232 Hagenberg (AT). ZEHETHOFER, Karl [AT/AT]; Unionstrasse 39, A-4020 Linz (AT).
- (74) Anwalt: SECKLEHNER, Günter; Rosenauerweg 268, A-4580 Windischgarsten (AT).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT (Gebrauchsmuster), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (Gebrauchsmuster), CZ, DE (Gebrauchsmuster), DE, DK (Gebrauchsmuster), DK, DM, DZ, EC, EE (Gebrauchsmuster), EE, ES, FI (Gebrauchsmuster), FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DEVICE FOR ANALYZING NUCLEIC ACID

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG ZUR ANALYSE VON NUKLEINSÄURE



(57) Abstract: The invention relates to a device for analyzing at least one analyte from a sample. The inventive device comprises a support (1) with a surface (2) on which at least one predefined analytical zone (3) and at least one predefined control zone (4) are arranged. At least one first binding partner which specifically binds to at least one analyte is immobilized in the predefined analytical zone (3). At least one further binding partner is disposed in the at least one control zone (4) and allows at least one control for determining the quality of analysis.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 03/014382 A2



IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (Gebrauchsmuster), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(84) **Bestimmungsstaaten** (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

---

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Analyse von zumindest einem Analyten aus einer Probe, umfassend einen Träger (1) mit einer Oberfläche (2), auf welcher zumindest ein vordefinierbarer Analysebereich (3) und zumindest ein vordefinierbarer Kontrollbereich (4) angeordnet sind, wobei in dem vordefinierten Analysebereich (3) zumindest ein erster Bindungspartner immobilisiert ist, der spezifisch an zumindest einen Analyten bindet. In dem zumindest einen Kontrollbereich (4) ist zumindest ein weiterer Bindungspartner für zumindest eine Kontrolle zur Bestimmung der Qualität der Analyse angeordnet.

- 1 -

Vorrichtung zur Analyse von Nukleinsäure

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Analyse von zumindest einer Nukleinsäuresequenz, ein Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuresequenzen, ein Verfahren zur Identifikation von Nukleinsäuresequenzen, einen Oligonukleotidprimer und einen Analysekit entsprechend den Merkmalen in den Oberbegriffen der Ansprüche 1, 24, 28, 30 und 31 sowie die Verwendung der Vorrichtung bzw. des Analysekits entsprechend den Ansprüchen 32 bis 35.

Eine Vielzahl von Krankheiten wird durch bakterielle Infektionen verursacht, so unter anderem auch Parodontitis, insbesondere Periodontitis, eine entzündliche, durch bakterielle Beläge verursachte, Erkrankung aller Anteile des Parodontiums mit fortschreitendem Verlust von Stützgewebe. Parodontitis ist ein häufiges Problem, daß einen großen Prozentsatz der Bevölkerung betrifft. Durch den Einsatz von Antibiotika ist die Erkrankung in der Regel gut therapierbar. Allerdings führt gerade in letzter Zeit die häufige und teilweise ungezielte Verwendung von Antibiotika zur Behandlung diverser Erkrankungen zu einer Zunahme von Resistenzbildungen vieler Bakterien. Weiters erfordert ein verzögerter bakteriologischer Befund zunächst eine Breitspektrum-antibiotische Therapie, die für den Patienten mehr Nebenwirkungen bedeutet und teurer ist. Außerdem können über den Umweg einer unspezifischen antibiotischen Therapie weitere therapeutische Maßnahmen erforderlich werden was demzufolge eine verringerte Effektivität, einen protrahierten Krankheitsverlauf und eine ineffiziente Ausnützung der ohnehin im Gesundheitssystem begrenzt zur Verfügung stehenden Ressourcen bedeutet. Aus diesen Gründen ist der richtige bakteriologische Befund für die zielführende Therapie maßgebend. Die Identifikation der pathogenen Bakteriengattung bzw. -art führt sowohl zur Optimierung der Diagnose als auch zum gezielten Einsatz des entsprechenden Antibiotikums. Auch der Zeitfaktor in der Diagnoseerstellung spielt für den Krankheitsverlauf eine wichtige Rolle. Aufwendige diagnostische Tests, die nur in speziell ausgestatteten Labors durchgeführt werden können, und eine langsame und ungenaue Diagnoseerstellung führen einerseits durch den Aufwand von hochqualifiziertem Personal für das Labor zu hohen Kosten andererseits durch die ungezielte Therapie der Erkrankung zu volkswirtschaftlichem Schaden. Es wird daher versucht die Methoden zur Identifikation von Bakteriengattungen und -arten so einfach und so rasch wie möglich zu gestalten und trotzdem die Korrektheit der Ergebnisse zu gewährleisten. Undeutliche und somit nicht aussagekräftige Analyseergebnisse erfordern schlimmstenfalls die Wiederholung der Probenentnahme einschließlich deren erneute Analyse und steigern somit die Kosten und den Zeitaufwand. Um diese Vorkommnisse zu vermeiden, wurden im Stand der Technik bislang verschiedenste Lösungen vorgeschlagen.

- 2 -

So dienen z. B. mikroskopische Untersuchungen zur schnellen Analyse. Sie lassen eine Beurteilung nach morphologischen Merkmalen wie Form, Größe, Pseudozellverbänden, Färbeverhalten, Vorhandensein von Flagellen bzw. einer Kapsel und Sporenbildung zu. Eine Anwendung zur Beurteilung morphologischer Merkmale besteht darin, daß, wie beispielsweise  
5 in der WO 93/25903 A aufgezeigt, morphologische Veränderungen von polymorphonuklären Leukozyten von Zahnpatienten nach Inkubation mit *Porphyromonas gingivalis* mit polymorphonuklären Leukozyten von gesunden Personen verglichen und analysiert werden. Diesen Untersuchungsmethoden haftet jedoch der Nachteil an, daß Bakterienarten mit ähnlichen morphologischen Merkmalen nur ungefähr klassifiziert werden können. Die Zuordnung der  
10 Bakterien mit ähnlichen morphologischen Merkmalen hängt auch vom jeweiligen Laboranten ab und dadurch wird nur eine sehr ungenaue Analyse der Bakterienarten ermöglicht.

Mikrobiologische Untersuchungen ermöglichen durch den Nachweis physiologischer Merkmale mit Indikatormedien, die z. B. eine Änderung des pH-Werts anzeigen, eine genaue Bestimmung der Bakteriengattung bzw. -art. Der Nachteil, der in mikrobiologischen Analysesystemen zu sehen ist, ist daß nur Lebendkeime nachzuweisen sind, was eine sorgfältige Probenentnahme und einen entsprechenden Probentransport erfordert, und weiters, daß die Analyse mehrere Tage bis Wochen dauert.

Serologische Untersuchungen können Proteinbestandteile von Bakterien, welche mit Antikörpern reagieren, nachweisen. Die Verwendung von monoklonalen Antikörpern ermöglicht den Nachweis von einzelnen Bakteriengattungen und -arten. Antikörper gekoppelte Enzym-Reaktionen ermöglichen die Detektion. Ein derartiges Identifikationssystem besteht darin, daß, wie beispielsweise in der US 4,741,999 A aufgezeigt, die Verwendung von monoklonalen Antikörpern zur Detektion und Konzentrationsbestimmung bestimmter Mikroorganismen betreffend die Etiologie von humanen periodontalen Erkrankungen dient. Im speziellen wird ein monoklonaler Antikörper spezifisch zu einem Antigen von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* beschrieben. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* kommt meist bei juveniler Parodontitis vor. Den serologischen Systemen haftet jedoch der Nachteil an, daß mit monoklonalen Antikörpern nur einige wenige Epitope eines Antigens nachgewiesen werden können.  
25  
30 Die Anzahl der verfügbaren Antikörper ist daher auf bestimmte Bakterienarten beschränkt.

Um diesen Nachteil auszuräumen wurden im Stand der Technik verschiedenste Systeme vorgeschlagen. Nukleinsäureuntersuchungen sind die modernsten und sichersten Methoden um  
35 spezies-spezifische Bakterien DNA Moleküle zu analysieren. Man unterscheidet zwischen

Nachweismethoden direkt aus dem Untersuchungsmaterial und Methoden mit vorheriger Amplifikation. Die dazwischengeschaltete Amplifikation erhöht die Sensitivität der Methode und ermöglicht auch den Nachweis von geringen Bakterien DNA Mengen unabhängig von deren Vitalität.

5

So ist zum Beispiel in der WO 00/52203 A eine Methode zur Identifikation von Bakterien beschrieben, welche die Amplifikation eines Teils der 23S-rDNA unter Verwendung des Primers 5' GCGATTTTCYGAAYGGGGRAACCC-3' und des Primers 5'-TTCGCCTTTCCTCACGGTACT-3' beschreibt. Das Amplifikat wird mit verschiedenen Oligonukleotiden auf einer Nylonmembran hybridisiert. Diese Methode erlaubt die Identifikation von mindestens 8 Bakterienarten in einem Test, wobei die Bakterien aus einer Gruppe ausgewählt sind, die Bakterien wie *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterokokkus* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Pneumococci* und Koagulase negative Staphylokokken umfassen. Diesem System haftet jedoch der Nachteil an, daß die 23S-rDNA variabel ist und zur Identifizierung der Bakteriengattungen und -arten daher in wenigen Konsensusbereichen geeignete Primärsequenzen für die zu analysierenden Bakteriengattungen und -arten gefunden werden müssen. Dies schränkt wiederum die Anzahl der analysierbaren Bakterienarten ein.

Um diesen Nachteil auszuräumen, wird im Stand der Technik folgendes System vorgeschlagen. So ist z. B. aus der DE 199 44 168 A1 eine Methode bekannt, welche ein Verfahren zum Genus-spezifischen Nachweis und der Speziesidentifizierung von Bakterien der Gattungen *Helicobacter* und *Wolinella*, welches auf Vermehrung eines speziellen Genfragmentes der für die Kodierung der 16S-rRNA und dessen weiterer Analyse basiert, beschreibt. Indem spezielle neue Oligonukleotidprimer von etwa 18 Basenpaaren Länge für das Verfahren verwendet werden, welche dadurch charakterisiert sind, daß sie in zwei neu beschriebenen Konsensussequenzen für das 16S-rRNA Gen hybridisieren, entstehen Amplifikationsprodukte nur dann, wenn Bakterien der Gattungen *Helicobacter* oder *Wolinella* in der Probe enthalten sind. Im Falle eines positiven Nachweises wird das resultierende Amplifikationsprodukt durch DNA-Sequenzierung analysiert. Durch Sequenzvergleich erfolgt die Identifizierung der vorliegenden Spezies. Alternativ kann für die Speziesidentifikation eine Restriktionsanalyse des Amplifikationsproduktes im Sinne eines RFLP (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) verwendet werden. Aus dem Bandenmuster wird auf vorliegende Spezies geschlossen. Der Nachteil der in diesem System zu sehen ist, liegt vor allem darin, daß die direkte Sequenzierung lange dauert und teuer ist und mit RFLP zwar Sequenzvariationen identifiziert werden

- 4 -

können aber nicht viele Bakterienarten unterschieden werden können. Ein weiterer Nachteil ist, daß die Oligonukleotidprimer nur komplementäre Sequenzen in den Gattungen *Helicobacter* und *Wolinella* finden, und daher nur diese beiden Gattungen nachweisen und analysieren können.

5

Ein weiterer Nachteil, der in all diesen Systemen zu sehen ist, liegt vor allem darin, daß Kontrollen zum Qualitätsnachweis der verschiedenen Analysen fehlen.

10

Aufgabe der Erfindung ist es daher, eine Möglichkeit zur reproduzierbaren, schnellen und einfachen Analyse von Nukleinsäuresequenzen anzugeben. Es ist weiters eine Teilaufgabe der Erfindung die Identifikation von mit Parodontitis assoziierten Bakterienarten zu ermöglichen.

15

Die Aufgabe der Erfindung wird durch die Vorrichtung entsprechend den Merkmalen im Kennzeichenteil des Anspruches 1 gelöst. Der Vorteil dieser Vorrichtung liegt darin, daß für die Analyse verschiedener Analyten Kontrollsysteme auf der Vorrichtung vorhanden sind, welche dieselben Verfahrensschritte wie die spezifischen Bindungspartner für den Analyten durchlaufen und damit dem Anwender ohne zusätzlichen Zeitaufwand eine Möglichkeit zur Verfügung steht, die Qualität des Analyseergebnisses über diese Kontrollsysteme zu beurteilen bzw. zu verbessern. Dies ist insbesondere dann von Vorteil, wenn die einzelnen Verfahrensschritte zur Analyse von mehreren Personen, womöglich an verschiedenen Orten durchgeführt werden und diese nicht miteinander kommunizieren. Unklare Ergebnisse können dadurch auf mögliche Fehlerquellen zurückverfolgt werden. Ein weiterer Vorteil ist, daß die Verfahrenskosten unter Anwendung der Vorrichtung im Vergleich zu Verfahren ohne Kontrollen kaum bis nicht erhöht sind. Es ist weiters von Vorteil, daß für den Fall, daß die Vorrichtung für Nachkontrollen oder spätere Auswertungen archiviert wird, die speziesspezifischen, amplifizierten und hybridisierten Analyten zusammen mit den Qualitätskontrollen archiviert werden können, so daß jederzeit der Verfahrensablauf nachkontrollierbar ist und die Auswertung mit gleichbleibender Qualität wiederholt werden kann.

20

25

30

Vorteilhaft erweist sich weiters eine Weiterbildung nach Anspruch 2, wonach durch die Möglichkeit die Bindungspartner auf verschiedenen Trägern zu immobilisieren die Anschaffung von Bearbeitungs- und Auswertungsgeräten für nur eine Art von Träger obsolet wird und somit die Kosten für die Analyse deutlich reduziert werden, weil sowohl bereits bestehende Bearbeitungs- und Analysegeräte genutzt werden können als auch bei einer Anschaffung neuer Geräte diese multipel einsetzbar sind.

35

Dabei erweist sich eine Ausgestaltung nach Anspruch 3 als vorteilhaft, weil mit der gleichen Vorrichtung eine große Anzahl von unterschiedlichen Analyten nachgewiesen werden kann ohne die Vorrichtung anpassen zu müssen. Weiters ist von Vorteil, daß durch die Vielfältigkeit der Vorrichtung keine spezielle Einschulung des durchzuführenden Personals für die verschiedenen Analyten erforderlich ist und somit eine Vielzahl von Analyten von nur einer Person ausgewertet werden kann. Als vorteilhaft erweist sich weiters, daß mehrere Analyten auf einer Vorrichtung gleichzeitig ausgewertet werden können.

Von Vorteil ist dabei die Weiterbildung nach Anspruch 4, womit eine Kontrollmöglichkeit für die Ausrichtung der Vorrichtung sowohl während der Auswertung als auch nach der Auswertung gegeben ist. Die falsche Orientierung des Trägers kann bereits vom Auswertegerät erkannt werden. Die Auswertung kann sofort abgebrochen werden und somit können die Kosten für diesen und/oder nachfolgende Verfahrensschritte eingespart werden.

Gemäß der Ausbildung nach Anspruch 5 erweist sich von Vorteil, daß die spezifische Bindung des zumindest ersten und/oder weiteren Bindungspartners an den Analyten, der die Probe unterzogen wird, nachprüfbar und nachvollziehbar ist.

Vorteilhaft erweist sich eine Ausgestaltung nach Anspruch 6, wonach durch den gezielten Nachweis eines Fehlers in der Amplifikation des Analyten eine aufwendige Fehlersuche nach Vorliegen des Analyseergebnisses auf den Amplifikationsschritt beschränkt werden kann und nicht die gesamte Analyse auf die Fehlerquelle durchsucht werden muß.

Von Vorteil zeigt sich auch die Ausgestaltung nach Anspruch 7, weil Verwechslungen von zu analysierenden Proben, welche vor Beginn der Analyse stattgefunden haben, rasch nachgewiesen werden können. Des weiteren erweist sich von Vorteil, daß die Quelle, aus welcher der zumindest eine Analyt stammt, bestimmt werden kann, und somit auch nach der Analyse noch eine Zuordnung der Probe durchgeführt werden kann.

Die Weiterbildung nach Anspruch 8 erweist sich als vorteilhaft, wobei durch eine Anbindung eines zumindest weiteren spezifischen Bindungspartners an den zu analysierenden als auch an einen weiteren Bindungspartner der zu identifizierende Analyt nachweisbar ist, wenn für den weiteren Analyten noch ein zusätzlicher weiterer spezifischer Bindungspartner vorhanden ist. Aus der Differenz der detektierbaren Signale resultiert das Signal des zu analysierenden Analyten.

Von Vorteil ist auch eine Weiterbildung nach Anspruch 9, wobei die Anbindung des gleichen spezifischen Bindungspartners an zwei verschiedene Analyten, die eine sehr ähnliche Struktur aufweisen, nachgewiesen werden kann. Durch die Verwendung eines weiteren nur für den einen Analyten spezifischen Bindungspartner kann die Präsenz eines weiteren ebenfalls an  
5 den gleichen Bindungspartner bindenden aber unerwünschten Analyten identifiziert werden. Weiters erweist sich von Vorteil, wonach der Nachweis einer Kontamination der Probe mit z.B. infektiösen Material ermöglicht wird. Das analysierende bzw. medizinische Personal kann frühzeitig informiert und gewarnt werden und somit das Infektionsrisiko und die eventuell daraus resultierenden Folgekosten minimiert werden.

10

Vorteilhaft ist auch eine Ausgestaltung nach Anspruch 10, wonach zumindest eine semiquantitative Bestimmung des Analyten in der Ursprungsprobe ermöglicht wird, weil durch die Zugabe einer genau definierten Menge eines Stoffes mit ähnlichem Verhalten wie der Analyt die Quantität und auch Qualität der Isolierung bestimmt werden kann.

15

Von Vorteil zeigen sich auch die Weiterbildung nach den Ansprüchen 11 und 14, wobei die Intensität des Signals mit einem Standard verglichen werden kann und somit eine Abgleichung erfolgen und eine Relativierung und Normierung des Ergebnisses durchgeführt werden kann.

20

Gemäß Anspruch 12 kann das Aufbringen des spezifischen Bindungspartners auf den Träger unmittelbar nach diesem Schritt aber noch vor Beginn der Analyse durchgeführt werden, wonach durch die Verwendung nur einwandfreier Träger die Qualität der Analyse auf einem hohen Niveau sichergestellt werden kann und somit unnötige Kosten durch die Verwendung  
25 von fehlerhaften Vorrichtungen vermieden werden.

Vorteilhaft erweist sich eine Ausgestaltung nach Anspruch 13, wonach eine gleichmäßige Intensität der Signale bei der Auswertung der Analyse gewährleistet werden kann und somit Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher Intensitäten der Signale das Ergebnis nicht verfälschen.  
30

Gemäß Anspruch 15 kann die Oberfläche der Vorrichtung auf unspezifische Anlagerungen von Analyten überprüft und somit ein Signal, welches durch eine unspezifische Bindung eines Analyten entsteht, und zu einem falschen Ergebnis betreffend die Identifikation des Analyten  
35 führen würde, erkannt werden.



- Von Vorteil sind auch die Weiterbildungen der Vorrichtung nach den Ansprüchen 16 bzw. 17, womit die Intensität der durch die Auswertung entstandenen Signale in diversen Abstufungen vorliegt, da eine zu hohe Konzentrationen der Positivkontrollen eine Überlagerung der Signale verursachen würde, wodurch die Klarheit der Analyseergebnisse gefährdet ist. Damit
- 5 kann die Vorrichtung unabhängig von einer zu erwartenden Konzentration des Analyten universell angewandt werden. Weiters ist von Vorteil, daß die unterschiedlichen Konzentrationen der Bindungspartner eine Quantifizierung der Analyten, wie z. B. von Genexpressionen, ermöglichen.
- 10 Vorteilhaft ist weiters eine Ausgestaltung nach Anspruch 18, wonach durch die Anordnung identischer Bindungspartner auf dem Träger in mehreren Analyse- und/oder Kontrollbereichen die Analyse mit größerer Sicherheit erfolgen kann. Zweifelhafte Ergebnisse in einem bestimmten Analyse- und/oder Kontrollbereich können durch das Ergebnis in zumindest einem weiteren Analyse- und/oder Kontrollbereich bestätigt oder widerlegt werden. Weiters ist
- 15 von Vorteil, daß durch die mehrfache Anordnung der gleichen Positivkontrollen, sowohl in unterschiedlichen als auch in gleichen Konzentrationen, eine Normierung innerhalb einer bzw. auch zwischen verschiedenen Messungen durchgeführt werden kann. So können z. B. durch Berechnung eines Korrekturfaktors die Messungen in den Analysebereichen einer Vorrichtung mit der auf einer bzw. mehreren anderen Vorrichtungen miteinander verglichen werden.
- 20 Es können selbstverständlich auch die Messungen in den Analysebereichen auf derselben Vorrichtung durch Berechnung eines Korrekturfaktors normiert werden.
- Dabei erweist sich eine Ausgestaltung nach Anspruch 19 vorteilhaft, wonach z. B. während der Herstellung der Vorrichtung nicht erkannte, schadhafte Stellen am Träger und/oder un-
- 25 gleichmäßige Auswertebedingungen über zumindest einen weiteren Analyse- und/oder Kontrollbereich auf der Vorrichtung durch die nicht benachbarte Anordnung des gleichen Bindungspartner in zumindest einem weiteren Analyse- und/oder Kontrollbereich des Trägers erkannt bzw. kompensiert werden können.
- 30 Gemäß den Ausgestaltungen in den Ansprüchen 20 und 21, können Nukleinsäuresequenzen vieler verschiedener Bakteriengattungen und -arten in beliebiger Kombination gleichzeitig analysiert und damit ein entsprechender Zeitgewinn bzw. ein erhöhter Durchsatz im Labor realisiert werden.
- 35 Von Vorteil ist dabei eine Weiterbildung der Vorrichtung nach Anspruch 22, womit mit nur

einem Oligonukleotidprimer bzw. -primerpaar eine Qualitätskontrolle für verschiedene Verfahrensschritte, insbesondere der Amplifikation, zur Verfügung steht. Weiters können durch die Verwendung zumindest einer dieser Oligonukleotidsequenzen die erforderlichen Schritte für die Optimierung der erfolgreichen Amplifizierung minimiert werden.

5

Gemäß Anspruch 23 können auf vorteilhafte Weise unterschiedliche Zielnukleinsäuresequenzen unter Verwendung von nur einem Oligonukleotidprimer bzw. -primerpaar analysiert werden, weil durch die entsprechende Auswahl der Oligonukleotidsequenzen am Träger gleichzeitig amplifizierte Zielnukleinsäuresequenzen komplementäre Bereiche aufweisen und daher

10

hybridisieren können.

Die Aufgabe der Erfindung wird jeweils eigenständig auch durch ein Verfahren entsprechend den Merkmalen im Kennzeichenteil der Ansprüche 24 und 28 gelöst. Vorteilhaft daran ist, daß mehrere Zielnukleinsäuresequenzen mit nur einer Primersequenz, insbesondere von mit

15

Parodontitis assoziierten Bakteriengattungen bzw. -arten, gleichzeitig amplifiziert bzw. identifiziert werden können. Damit können in der Folge die Verfahrenskosten für das Labor gesenkt und die Durchführbarkeit des Verfahrens vereinfacht werden, da die Verwechslungsgefahr betreffend unterschiedliche Oligonukleotidprimer für unterschiedliche Zielnukleinsäuresequenzen minimiert werden. Das Verfahren kann damit auch von weniger erfahrenen Personen durchgeführt werden. Von Vorteil ist dabei weiters, daß die Lagerhaltung vereinfacht sowie die dadurch verursachten Kosten für ein Labor gesenkt werden können, indem die Anzahl unterschiedlicher Reagenzien gesenkt werden kann. Durch den größeren Verbrauch an einem Primer können weiters auch die Anschaffungskosten für Chemikalien gesenkt werden und kann durch den größeren Umsatz dieses Primers die Lagerdauer und damit die Gefahr der

20

25

Unbrauchbarkeit desselben verringert werden.

Vorteilhafte Weiterbildungen des Verfahrens zur Amplifikation von zumindest einer Zielnukleinsäuresequenz sind in den Ansprüchen 25 bis 27 gekennzeichnet.

30

So ist bei einer Weiterbildung nach Anspruch 25 von Vorteil, daß mehrere Bakterienarten gleichzeitig amplifiziert werden können und dadurch sowohl Kosten, Zeit als auch Material eingespart werden können.

35

Von Vorteil ist aber auch die Weiterbildung nach Anspruch 26, weil durch Verwendung der Gensequenzen für die 16S-rRNA mit nur einem Primerpaar Sequenzen unterschiedlicher

Bakterienarten amplifiziert werden können. Die Gensequenz für die 16S-rRNA besitzt einerseits hochkonservierte Konsensusregionen, an die die Oligonukleotidprimer binden und andererseits dazwischenliegende genus- oder artenspezifische Regionen. Durch die Amplifikation von Teilsequenzen der Gene, welche die 16S-rRNA kodieren, erübrigt sich die Verwendung vieler verschiedener Oligonukleotidprimersequenzen und die Optimierung der Amplifikationsbedingungen für die jeweilige Oligonukleotidprimersequenz.

Durch die Weiterbildung nach Anspruch 27 kann erreicht werden, daß die Hybridisierungsprodukte, d. h. das Amplifikat gebunden an das komplementäre Oligonukleotid, ein Signal erzeugen können. Dadurch wird die Erhöhung des Automatisierungsgrads und somit eine Verringerung der Personalkosten erzielt.

Vorteilhaft ist weiters eine Ausführung des Verfahrens zur Identifikation von zumindest einer Zielnukleinsäuresequenz nach Anspruch 29, weil die Kontrolle und die Analyse auf nur einer Analysevorrichtung durchgeführt wird und sich daher aufwendige zusätzliche Kontrollen in womöglich einer anderen Analysevorrichtung erübrigen.

Die Aufgabe der Erfindung wird eigenständig auch durch einen Oligonukleotidprimer entsprechend den Merkmalen im Kennzeichenteil des Anspruches 30 gelöst. Vorteilhaft daran ist, daß Amplifikationsprodukte, entstanden durch die Amplifikation mit diesem Primer bzw. einem aus diesen gebildeten Primerpaar, mit einer komplementären Oligonukleotidsequenz für zumindest eine Positivkontrolle und/oder Zielnukleinsäuresequenz an einen Träger hybridisieren und durch das entstandene Signal eine Qualitätsüberprüfung des Verfahrens und/oder eine Identifikation der Bakterienarten ermöglicht wird.

Die Aufgabe der Erfindung wird eigenständig auch durch einen Analysekit entsprechend den Merkmalen im Kennzeichenteil des Anspruches 31 gelöst. Vorteilhaft ist daran, daß der Analysekit sowohl die Vorrichtung als auch die Oligonukleotidprimer für die gleichzeitige Amplifikation verschiedener Bakterienarten enthält. Das Analyseergebnis enthält parallel auch Ergebnisse über die durchgeführten Kontrollen während der Analyse, so daß allfällige Fehler vor bzw. mit der Auswertung der Analyten erkannt werden können und damit eine langwierige Ursachenforschung und gegebenenfalls ein erforderlicher Optimierungsaufwand verringert werden kann.

Die Aufgabe der Erfindung wird eigenständig auch durch die Verwendung der Vorrichtung

entsprechend den Merkmalen im Kennzeichenteil der Ansprüche 32 und 33 gelöst. Vorteilhaft daran ist, daß Analyten von mit Parodontitis assoziierten Bakterienarten identifiziert werden können und somit eine genaue Analyse der assoziierten Keime erreicht werden kann.

- 5 Die Aufgabe der Erfindung wird eigenständig auch durch die Verwendung des Analysekits entsprechend den Merkmalen im Kennzeichenteil der Ansprüche 34 und 35 gelöst. Von Vorteil erweist sich, daß durch die Verwendung des Analysekits bereits ein komplettes Set zur Identifikation diverser Bakterienarten oder verschiedener Genexpressionsmuster zur Verfügung steht und die Komponenten nicht einzeln gekauft und aufeinander abgestimmt werden müssen. Weiters ist von Vorteil, daß dadurch rasch der Nachweis von mit Parodontitis, insbesondere Periodontitis, assoziierten Keimen erfolgen kann und daher die Folgekosten einer primär ungezielten antibiotischen Therapie verhindert werden können.

- 15 Zum besseren Verständnis der Erfindung wird diese anhand der nachfolgenden Fig. 1 näher erläutert, wobei diese in schematisch vereinfachter Darstellung eine Vorrichtung mit Bindungspartnern, angeordnet in Analyse- bzw. Kontrollbereichen zeigt.

- 20 Die Fig. 1 zeigt eine Vorrichtung zur Analyse zumindest eines Analyten. Diese Vorrichtung umfaßt einen Träger 1, vorzugsweise plättchenförmig, mit einer Oberfläche 2 auf der mehrere Analysebereiche 3 und mehrere Kontrollbereiche 4, angeordnet sind. Es ist aber selbstverständlich möglich, daß in einer Minimalausführung nur jeweils ein Analyse- bzw. Kontrollbereich 3,4 oder aber, daß ein Analysebereich 3 und mehrere Kontrollbereiche 4 bzw. umgekehrt angeordnet sind.

- 25 Alternative Ausführungsformen der Vorrichtung sind Träger 1 in plättchenförmiger Ausgestaltung, wobei an dessen Oberfläche 2 Vertiefungen ausgebildet sind, wie z. B. Chamberslides.

- 30 Eine weitere Ausführungsform des Trägers 1 stellen Mikrotiterplatten nach Abmessungen gemäß den Empfehlungen der SBS (Society of Biomolecular Screening) dar.

Der bzw. die Analysebereich(e) 3 und/oder der bzw. die Kontrollbereich(e) 4 können auf der Oberfläche 2 des Trägers 1 an jeder beliebigen, vordefinierbaren Stelle angeordnet sein.

- 35 Als Träger 1 kann vorzugsweise ein silanisierter Glasträger verwendet werden. Es ist aber

- 11 -

auch möglich den Träger 1 aus Kunststoff, Stein, Metall, etc. zu bilden bzw. können mit Aldehyd, Aminosilan, Streptavidin, Biotin, Thiol, magnetischen Materialien oberflächenbehandelte Träger ebenfalls verwendet werden.

- 5 Es sei an dieser Stelle erwähnt, daß Fig. 1 nur ein Beispiel der erfindungsgemäßen Vorrichtung zeigt. Es können auch andere Formen, wie z. B. ein Würfel, eine Kugel, bzw. andere Querschnitte der plättchenförmigen Ausbildung, wie z.B. quadratische, runde, etc., für die Vorrichtung verwendet werden.
- 10 So ist z.B. möglich zumindest annähernd kugelförmige Vorrichtungen mit mehreren Analyse- bzw. Kontrollbereichen 3,4 oberflächlich zu versehen, wobei diese Vorrichtungen in der Folge in eine zu analysierende flüssige Probelösung gegeben werden. Gegebenenfalls können diese derart ausgebildeten Vorrichtungen mit einer Schicht aus einem magnetischen Material versehen sein, so daß die Entfernung der Vorrichtungen nach Anbindung der Zielnukleinsäuren aus der Probelösung einfach möglich ist.
- 15

Vorzugsweise ist die Vorrichtung jedoch plättchenförmig ausgebildet und wird bzw. werden die zu untersuchenden Probe(n) auf diese Vorrichtung aufgebracht.

- 20 Weiters ist es möglich die Vorrichtung mit zumindest einer Deckschicht auf zumindest einer der Oberflächen 2 des Trägers 1 zu versehen, um damit die darunter liegende Oberfläche 2 vor unbeabsichtigten, äußeren Einwirkungen zu schützen, z.B. vor Zerkratzen und damit Zerstörungen von Oberflächenbereichen. Diese Deckschicht kann auch zumindest teilweise entfernbar angeordnet sein.

- 25 Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann zur Analyse von vielen verschiedenen Analyten verwendet werden. Im nachfolgenden können die Begriffe Nukleinsäure, Nukleinsäuresequenz und Zielnukleinsäuresequenz durch einen Begriff ausgewählt aus einer Gruppe umfassend Nukleinsäuren, wie z.B. DNA, RNA, PNA (Peptidnukleinsäuren), Proteine, wie z.B. Antikörper, Epitope, Antigene, Scaffold Proteine, Fusionsproteine, insbesondere rekombinante Fusionsproteine, Signalproteine, Transmitter, Enzyme, Substrate, Hormone, Peptide, Lipide, Kohlenhydrate, wie z.B. Mono-, Di-, Oligo- und Polysaccharide, und deren modifizierten Formen, etc., wahlweise ersetzt werden. Selbstverständlich kann parallel dazu auch der Begriff Oligonukleotid auf ersten oder weiteren Bindungspartner ausgedehnt werden, wobei der
- 30
- 35 Bindungspartner ein Molekül ausgewählt aus einer Gruppe umfassend Nukleinsäuren, wie

- 12 -

z.B. DNA, RNA, PNA (Peptidnukleinsäuren), Proteine, wie z.B. Antikörper, Epitope, Antigene, Scaffold Proteine, Fusionsproteine, insbesondere rekombinante Fusionsproteine, Signalproteine, Transmitter, Enzyme, Substrate, Hormone, Peptide, Lipide, Kohlenhydrate, wie z.B. Mono-, Di-, Oligo- und Polysaccharide, und deren modifizierten Formen, etc., darstellen  
5 kann.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung wird vorzugsweise in der Analyse von Analyten, insbesondere Nukleinsäuren von Bakterienarten eingesetzt, insbesondere von mit Parodontitis assoziierten. Obwohl die folgende Beschreibung auf diese Ausführung der Vorrichtung beschränkt wird, sei jedoch bemerkt, daß die Vorrichtung auch für andere Analyten und Nukleinsäuresequenzen verwendbar ist, und sind daher die folgenden Ausführungen für den Schutzzumfang nicht limitierend zu verstehen.  
10

Die Erfindung umfaßt auch die Amplifikation der Zielnukleinsäuresequenz mit Hilfe eines Primers bzw. Primerpaares und deren Hybridisierung an Oligonukleotide in den Analyse- bzw. Kontrollbereichen 3,4.  
15

Weiters kann die Vorrichtung durch verschiedene Vorkehrungen, wie z. B. Ausnehmungen in der Oberfläche auch direkt für die Amplifikation von Nukleinsäuresequenzen verwendet werden. In diesem Fall kann die Vorrichtung zumindest bereichsweise eine Einrichtung zur Temperaturerhöhung, z.B. eine Heizschicht umfassen, um z.B. Temperaturwechselprogramme zu ermöglichen.  
20

Die, insbesondere verschiedenen, zur Zielnukleinsäuresequenz und/oder zu den Positivkontrollen komplementären Oligonukleotide können bevorzugt mit einem Nanoplotter durch piezoelektrische kontaktlose Probenübertragung auf dem Träger 1 in den Analyse- bzw. Kontrollbereichen 3,4 angebracht werden. Es können aber auch andere Verfahren zur Oligonukleotidverteilung verwendet werden wie Nadelprinter, Ring and Pinprinter, Elektro addressing Printer, Topspoter, etc. bzw. können diese auch manuell aufgetragen werden. Andere Verfahren sind selbstverständlich möglich und sind dem auf diesem Gebiet tätigen Fachmann bekannt.  
25  
30

Die Oligonukleotide können für die Identifizierung verschiedener Nukleinsäuresequenzen, insbesondere von Nukleinsäuresequenzen verschiedener Bakterienarten, verwendet werden. Idealerweise soll die jeweilige Oligonukleotidsequenz mit nur einer Bakterienspezies und  
35

deren Stämmen hybridisieren. Wie aus der WO 00/52203 A hervorgeht sind für die Identifizierung der in diesem Dokument angegebenen Spezies manchmal mehrere Oligonukleotidsequenzen für die Unterscheidung einzelner Bakterienspezies notwendig.

- 5 Wie bereits erwähnt, kann die Erfindung vorzugsweise zur Identifikation von mit Parodontitis assoziierten Bakterien verwendet werden. Derzeit sind an die 100 verschiedene, diese Erkrankung des Mundraumes, verursachende Bakterienarten bekannt. Um eine möglichst effiziente Analyse derartiger Bakterien zu ermöglichen weist die erfindungsgemäße Vorrichtung vorzugsweise mehrere, beispielsweise 20 verschiedene, Oligonukleotide dafür auf. So können in  
10 den Analysebereichen 3 Oligonukleotide für die Identifizierung von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Actinomyces odontolyticus*, *Actinomyces viscosus*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter concisus*, *Campylobacter gracilis* (*Bacteroides gracilis*), *Campylobacter rectus*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Eikenella corrodens*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*,  
15 *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Treponema denticola* und *Veillonella parvula* verwendet werden.

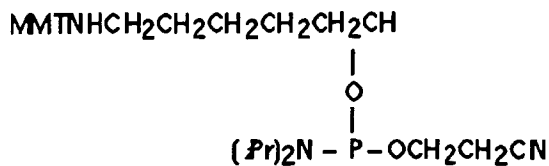
In einer weiteren Anwendungsmöglichkeit können Oligonukleotide auch für die Identifizierung verschiedener Nukleinsäuresequenzen, insbesondere von Genexpressionsmustern verschiedener Organismen, verwendet werden.  
20

Die Oligonukleotide bestehen bevorzugt aus 10 bis 120 Nukleotiden, können aber auch aus 15 bis 100 Nukleotiden, insbesondere aber aus 20 bis 50 Nukleotide, beispielsweise 33 Nukleotiden bestehen.  
25

Die Detektion von kurzen Nukleinsäuresequenzen amplifizierter DNA ist eine einfache Methode und kann daher auch in viel größerem Umfang, z.B. zur Identifikation von viralen Nukleinsäuresequenzen oder von Genvariationen, etc., als hier beschrieben durchgeführt werden.

- 30 Die Oligonukleotidsequenzen werden de novo synthetisiert. Die Oligonukleotide sind an zumindest einem Ende derart modifiziert, daß sie am Träger 1 in den Analyse- bzw. Kontrollbereichen 3,4 anhaften, insbesondere chemisch über dieses modifizierte Ende binden. So kann vorzugsweise das 5'-Ende mit dem Amino-Modifier C6 MMT (6-(4-Monomethoxytritylamino)hexyl-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidite mit folgender Strukturformel  
35 modifiziert werden.

- 14 -



Darin bedeutet MMT Monomethoxytrityl und Pr Isopropyl.

5 Selbstverständlich können auch andere Modifier verwendet werden, wie z.B. Succinyl, DNP (2,4-Dinitrophenyl), etc.

Es ist aber auch möglich das 3'-Ende bzw. sowohl das 5'- als auch das 3'-Ende der Oligonukleotidsequenzen derart zu modifizieren, daß die Anhaftung auf dem Träger 1 möglich wird.

10 Um die Oligonukleotide auf die Analyse- bzw. Kontrollbereiche 3,4 aufbringen zu können, werden diese in Lösung verwendet. Als Lösungsmittel können z.B. ein Tris-EDTA Puffer, oder Wasser verwendet werden. Andere verwendbare Lösungsmittel sind z.B. physiologische Natriumchloridlösung (0,9 % NaCl), PBS, Alkoholverdünnungen, Tris-Puffer, DMSO in  
 15 einer Konzentration ausgewählt aus einem Bereich mit einer oberen Grenze von 30 %, vorzugsweise 25 %, insbesondere 20% und einer unteren Grenze von 1 %, vorzugsweise 2 %, insbesondere 5 % etc.

Die Oligonukleotide werden dem Lösungsmittel in einer Menge zugesetzt, daß sie in einer Konzentration im Bereich zwischen 1 nM bis 1 mM, beispielsweise 10 nM bis 500 µM, vor-  
 20 zugsweise 100 nM bis 500 µM vorliegen. Als vorteilhaft haben sich auch Konzentrationen im Bereich zwischen 0,5 µM bis 100 µM, insbesondere 1 µM bis 50 µM erwiesen.

Die Bindungspartner können in gleichen oder verschiedenen Konzentrationen in den Kontrollbereichen 4 vorgelegt werden. Dabei können Bindungspartner aufgebracht werden, die  
 25 eine Orientierungskontrolle des Trägers 1, z.B. in einer Auswertevorrichtung, wie z.B. einem Scanner, ermöglichen. Weiters können Bindungspartner für die Kontrollbereiche 4 verwendet werden, die eine Beurteilung der Qualität einer Amplifikation, wie z.B. einer PCR und/oder einer erfolgten Hybridisierung der Analyten verwendet werden.

30 Zum Nachweis der Probenidentität bzw. -art oder -matrix wird ein spezifischer Bindungspartner, wie z.B. eine Nukleotidsequenz oder ein Antikörper eines bestimmten Organismus,



- 15 -

wie z.B. Mensch, Tier oder Pflanze, oder für eine bestimmte Sorte oder Rasse, wie z.B. Rind, Schaf, Schwein, oder Birke, Palme, Tanne, etc. auf dem Träger 1 in einem vordefinierten Bereich immobilisiert. Die Identifizierung kann auch durch Zugabe von Material zur Probe wie z.B. Nanopartikel, Farbstoffe, etc., welche an den Kontrollbereichen 4 unterschieden werden, erfolgen. Die Identität kann sich auch aus einer Kombination von unterschiedlichen Markern ergeben.

Alternativ kann zum Nachweis von Proben unterschiedlicher Matrices, wie z.B. aus Blut, Serum, Plasma, Urin, Speichel, Fäces, etc., für jeden Analyten aus der gleichen Probe die gleiche Markierung verwendet werden. Dies erfolgt entweder durch direkte Markierung des Analyten mit einem Substrat wie z.B. Enzym, Biotin, Digoxigenin, radioaktive Markierung, Fluoreszenz- oder Chemilumineszenzmarkierungen, chemische Stoffe mit einem spezifischen Spektrum, wie z.B. Infrarot, etc. oder durch die Zugabe eines genau definierten Moleküls, wobei das Molekül für jede Probe unterschiedlichen Ursprungs andere Charakteristika aufweist und in der weiteren Analyse eindeutig identifizierbar ist.

Mit dem Nachweis des Ursprungs bzw. der Quelle, aus welcher beispielsweise Viren stammen kann der infizierte Wirtsorganismus nachgewiesen werden. Dies ist vor allem bei der Identifikation von Virenstämmen, welche unterschiedliche Wirtsorganismen befallen, von großer Bedeutung. Durch die Immobilisierung eines Bindungspartners, welcher eine phylogenetische Unterscheidung, wie z.B. komplementäre Sequenzen zum Cytrom B Gen, oder durch die Immobilisierung von Cytochrom B korrespondierenden Antikörpern werden die verschiedenen Wirtsorganismen nachgewiesen. Sowohl für die Analyse als auch für die weitere Vorgehensweise kann es entscheidend sein, aus welcher Quelle dieses Virus isoliert wurde um eventuell sofort Maßnahmen ergreifen zu können um beispielsweise eine weitere Ausbreitung des Erregers zu verhindern.

Bei einer weiteren Anwendung ist von großer Bedeutung, ob Prionen aus dem Nervensystem von Rindern oder von Schafen stammen um rechtzeitig Quarantäne über den betroffenen Bauernhof verhängen zu können, von welchem das erkrankte Tier stammt. Durch die Immobilisierung des spezifischen Bindungspartners für Prionen in Kombination mit einem individualspezifischen Bindungspartner, wie z.B. short tandem repeats (STR), variable number of tandem repeats (VNTR), single nucleotide polymorphism (SNP), etc., wird nachgewiesen, von welchem Individuum der gleichen Spezies die Prionen stammen.

Um Kreuzreaktionen eines spezifischen Bindungspartners mit mehreren Analyten ausschließen zu können, sind Kontrollen für Kreuzreaktionen auf der Vorrichtung angeordnet. Bei der Untersuchung von sehr nahe artverwandten Organismen kann es zu Kreuzreaktionen von spezifischen Bindungspartnern mit Analyten beider Arten kommen. Durch die Verwendung einer weiteren spezifischen Sonde, von der bekannt ist, daß sie nur an Analyten der einen Art bindet, kann somit die Kreuzreaktion nachgewiesen werden und die beiden Arten voneinander unterschieden werden. Das gleiche Prinzip ist auch für Antikörper anwendbar, die an zwei verschiedene Antigene binden, wobei hier für das zweite Antigen ein weiterer Antikörper vorhanden ist, von dem nachgewiesen wurde, daß er ein spezifischer Bindungspartner nur für die zweite Art ist.

Auf dem Träger können des weiteren auch spezifische Bindungspartner für Kontaminationen immobilisiert sein. Durch das Aufbringen eines spezifischen Bindungspartners für beispielsweise hoch infektiöse Viren kann das Vorhandensein dieser Viren in der Probe, in welcher auch der Analyt enthalten ist, nachgewiesen werden und somit nach Erhalt des Ergebnisses der Analyse das medizinische Personal vor potentiellen Infektionsmöglichkeiten frühzeitig gewarnt wird.

Durch die Immobilisierung eines spezifischen Bindungspartners für die Isolierungskontrolle wird die Menge des Analyten, welche während der Isolierung verloren gegangen ist, bestimmbar. Durch die Zugabe einer genau definierten Menge eines Stoffes vor der Aufreinigung der Probe zu den Analyten kann die Menge, die durch die Isolierungsarbeit verloren gegangen ist, bestimmt werden. Wichtig dabei ist, daß der zugegebene Stoff in seinem Verhalten dem Analyten sehr ähnlich ist, um eine repräsentative Aussage zu erhalten. Bei der Zugabe von DNA muß darauf geachtet werden, daß der Analyt in einer Probe vorliegt, welche DNase frei ist.

Zur Kontrolle der Bestimmung der Qualität und Quantität der Signalintensivierung ist am Träger 1 ein spezifischer Bindungspartner angeordnet, welcher eine Normierung der Intensität des Signals, welches durch Markierungen, wie z.B. durch enzymatische Markierung, Silberfärbung oder Markierung mit Goldpartikel, durch Fluoreszenz- bzw. Chemilumineszenzfarbstoffe, Biotin, Digoxigenin, radioaktive Markierungen, etc., erzielt werden, erlaubt. Um beispielsweise den Verstärkungsfaktor von Silberfärbung abschätzen zu können, bringt man z.B. Goldpartikel in einer definierten Menge am Träger 1 auf, die dann als Kristallisationspunkt dienen, analog zum Detektionssystem, wo beispielsweise der Primer über ein Biotin-

Streptavidin-System mit den Goldpartikeln gelabelt wird. Entsprechend wird eine definierte Anzahl von Bindungsstellen für eine Dendrimer-Signalverstärkung bzw. für enzymatische oder ähnlich wirksame katalytische Signalverstärkungssysteme am Träger 1 aufgebracht.

- 5 Um die Qualität der Hybridisierung zu bestimmen, wird entweder parallel zu jedem spezifischen Bindungspartner auch ein spezifischer Bindungspartnern für die Hybridisierungskontrolle, welche beispielsweise erst nach der Isolierung bzw. Amplifikation des Analyten aus der Probe zugegeben wird, immobilisiert. Andererseits kann auch eine Hybridisierungskontrolle zur Verfügung stehen, bei welcher der spezifische Bindungspartner für den Analyten  
10 und der spezifische Bindungspartner für die Hybridisierungssonde gekoppelt sind und somit in den gleichen Mengen vorliegen, wobei das Problem des unterschiedlichen Verhältnisses vom spezifischen Bindungspartner zum Analyten und vom spezifischen Bindungspartner zur Hybridisierungssonde, wenn diese getrennt vorliegen, eliminiert wird.
- 15 Um die Effektivität der Immobilisierung des spezifischen Bindungspartners auf dem Träger 1 zu überprüfen wird an den spezifischen Bindungspartner eine Markierung, z.B. eine Fluoreszenz- oder Chemilumineszenzmarkierung kovalent gebunden. Die erste Bestimmung der Printqualität erfolgt bereits nach der Immobilisierung der spezifischen Bindungspartner auf dem Träger 1 und nach der Hybridisierung wird ein weiteres Mal eine Auswertung mittels der  
20 Hybridisierungssonde durchgeführt. Durch diese Vorgangsweise kann eine Trennung in Kontrolle für den Printvorgang und in die Kontrolle für die Hybridisierung erfolgen.

- Eine weitere Ausführungsvariante stellt eine Markierung des spezifischen Bindungspartners mit drei unterschiedlichen Markierungen, wie z.B. Fluoreszenz- oder Chemilumineszenzmarkierungen dar, die in unterschiedlichen Signalen bei der Detektion resultieren. Beispielsweise  
25 ist eine Markierung die Kontrolle für die Immobilisierung des spezifischen Bindungspartners, die weitere Markierung eine Kontrolle für die Hybridisierung und die dritte Markierung eine Kontrolle für den Nachweis der Bindung des spezifischen Bindungspartners an den Analyten.

- 30 Eine weitere Möglichkeit, um die Qualität der Analyse bestimmen zu können, wird durch das Anbringen einer Markierungskontrolle, welche immer in der gleichen Konzentration auf dem Träger immobilisiert wird, und somit interassay Schwankungen nachgewiesen werden können. Kontrollbereiche 4 erlauben es Ergebnisse zu vergleichen, die auf unterschiedlichen Geräten bzw. zu verschiedenen Zeiten auch, wenn inzwischen das Gerät gealtert ist, gemacht  
35 wurden (z.B. die Lebensdauer eines PMT oder CCD Chips ist begrenzt). Es können auch Er-

gebnisse verglichen werden die mit unterschiedlichen Parametereinstellungen gemacht werden, wie z.B. Spannung beim PMT, Messzeit beim CCD-Chip, etc.

Alternativ kann auch eine Verdünnungsreihe der Kontrollbereiche 4 aufgebracht, damit die Meßfunktion bestimmt werden kann. Dadurch wird die Empfindlichkeit, Sensitivität, Detektionslimit, Linearität bzw. der dynamische Bereich der Meßfunktion bestimmt; dies ermöglicht eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Gerätetypen. Diese Kontrollbereiche 4 sollten natürlich für die jeweils verwendeten Markierungen verwendet werden. Bei der Verwendung von Substanzen mit einem breiteren Spektrum (Wellenlängen) kann auch die Qualität der Filter, und andere optische Eigenschaften abgeglichen werden.

Die Oligonukleotide für die Orientierungskontrolle können in Konzentrationen im Bereich von 1  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$ , insbesondere im Bereich von 1  $\mu\text{M}$  bis 50  $\mu\text{M}$ , vorzugsweise in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  vorliegen. Die Oligonukleotide für die Amplifikationskontrolle können in Konzentration im Bereich zwischen 0,1 nM bis 0,5 mM, beispielsweise 1 nM bis 100  $\mu\text{M}$ , vorliegen. Als vorteilhaft haben sich auch Konzentrationen im Bereich zwischen 5 nM bis 50  $\mu\text{M}$ , insbesondere 10 nM bis 10  $\mu\text{M}$  erwiesen. Die Oligonukleotide für die Hybridisierungskontrolle können in Konzentrationen im Bereich zwischen 0,1 nM bis 500  $\mu\text{M}$ , beispielsweise im Konzentrationsbereich von 1 nM bis 100  $\mu\text{M}$ , insbesondere von 10 nM bis 50  $\mu\text{M}$  vorliegen. Als vorteilhaft haben sich auch Konzentrationen im Bereich zwischen 25 nM bis 25  $\mu\text{M}$ , insbesondere 40 nM bis 10  $\mu\text{M}$ , erwiesen.

Es können weiters noch andere als die oben angegebenen Oligonukleotide für die Kontrollbereiche 4 verwendet werden, wie z.B. Oligonukleotide als Positivkontrolle mit einer Sequenz komplementär zur Oligonukleotidprimersequenz, welche für die Amplifikation der Zielnukleinsäuresequenz verwendet wird oder Oligonukleotide als Negativkontrolle mit einer Sequenz von anderen Organismen, die das Gen für die Kodierung der 16S-rRNA nicht besitzen.

Die Oligonukleotide können in den Kontrollbereichen 4 in Verdünnungsreihen vorliegen, wobei jeweils eine Konzentration pro Kontrollbereich 4 verwendet wird. Dazu hat es sich als vorteilhaft erwiesen, die Konzentration der Oligonukleotide mit einem Faktor ausgewählt aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 1,5, insbesondere 1,75, und einer oberen Grenze von 10, insbesondere 5, vorzugsweise mit einem Faktor 3 für die Hybridisierungskontrolle und/oder einem Faktor ausgewählt aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 1,25, insbesondere 1,5, und einer oberen Grenze von 10, insbesondere 5, vorzugsweise mit einem

Faktor 2 für die PCR-Kontrolle zwischen aufeinanderfolgenden Konzentrationen zu verringern. Die höchste Konzentration der Oligonukleotide kann 500  $\mu\text{M}$ , beispielsweise 250  $\mu\text{M}$ , insbesondere 100  $\mu\text{M}$  und vorzugsweise 10  $\mu\text{M}$  betragen. Eine Verdünnungsreihe kann 2 bis 24 Konzentrationen umfassen, wobei beispielsweise 3 bis 20 Konzentrationen, insbesondere 4 bis 18 Konzentrationen vorliegen. Als vorteilhaft haben sich auch 5 bis 15, insbesondere 6 bis 11, Konzentrationen erwiesen. Die Positivkontrollen können auch in logarithmischen Verdünnungsreihen vorliegen.

Die Ausführungen zu den Oligonukleotiden für die Kontrollbereiche 4 können selbstverständlich auf die Oligonukleotide für die Analysebereiche 3 entsprechend übertragen werden, so daß hier nur mehr die entsprechenden Konzentrationen bzw. Konzentrationsbereiche angegeben werden. Die Konzentration der Oligonukleotide in den Analysebereichen 3 liegen im Bereich von 100 nM bis 1 mM, beispielsweise von 1  $\mu\text{M}$  bis 500  $\mu\text{M}$ , insbesondere von 10  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  und vorzugsweise von 25  $\mu\text{M}$  bis 45  $\mu\text{M}$ .

Die Oligonukleotide werden vorzugsweise in Volumina ausgewählt aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 1  $\mu\text{l}$ , insbesondere 10  $\mu\text{l}$ , vorzugsweise 200  $\mu\text{l}$  und mit einer oberen Grenze von 5  $\mu\text{l}$ , insbesondere 1  $\mu\text{l}$ , vorzugsweise 0,3  $\mu\text{l}$ , pro Analysebereich 3 und/oder Kontrollbereich 4 aufgetragen.

Die Anordnung der Oligonukleotide auf dem Träger 1 ist vordefinierbar. Jedes Oligonukleotid kann eine Fläche von 50 bis 500  $\mu\text{m}$  Durchmesser einnehmen, insbesondere von 200 bis 250  $\mu\text{m}$ .

Vorzugsweise weist die für die Analyse verwendete Oberfläche 2 der Vorrichtung, die z. B. als Objektträger für die Mikroskopie ausgebildet sein kann, eine Fläche von 0,1  $\text{cm}^2$  bis 50  $\text{cm}^2$  beispielsweise 0,5  $\text{cm}^2$  bis 40  $\text{cm}^2$ , vorzugsweise 1  $\text{cm}^2$  bis 30  $\text{cm}^2$  auf. Als vorteilhaft haben sich auch Flächen im Bereich zwischen 1,5  $\text{cm}^2$  bis 20  $\text{cm}^2$ , insbesondere 2  $\text{cm}^2$  bis 15  $\text{cm}^2$  erwiesen.

Eine bevorzugte Anordnung der Oligonukleotide mit einer geringen Dichte ermöglicht einfache Hybridisierungsbedingungen, wie z. B. geringe Temperaturschwankungen, homogene Pufferverteilung, etc. und unkomplizierte Auswertemethoden, weil eine Überlappungen von Signalen normalerweise nicht zu erwarten ist.

Die Oligonukleotide bestehen aus Sequenzen die komplementär zu bestimmten Teilsequenzen der Zielsequenz sind und/oder komplementär zu zumindest einer Positivkontrolle sind.

5 Das Oligonukleotid für die Hybridisierungskontrolle dient als Qualitätsnachweis für die Hybridisierung. Beispielsweise ist eine Teilsequenz des Bakteriophagengenoms als Linkersequenz am 3'-Ende insertiert und das 5'-Ende mit dem erwähnten Amino-Modifizierer C6 MMT modifiziert. Als Linkersequenz kann aber auch jede beliebige chemische Verbindung, die den notwendigen räumlichen Abstand erzeugt und somit eventuell auftretende sterische Hindernisse vermeidet.

10

Das Oligonukleotid für die Orientierungskontrolle kann für die Bestimmung bzw. Festlegung der Ausrichtung des Trägers 1 während der Herstellung der Vorrichtung bzw. in späteren Analyseschritten dienen. Weiters kann die Orientierungskontrolle zur Bestimmung bzw. Festlegung der Grenzen des auszuwertenden Feldes, insbesondere durch die Analyse- und Kontrollbereiche 3,4 definiert, am Träger 1 und zur Überprüfung der Lokalisation des Lesefeldes dienen. Es kann vorzugsweise sequenzidentisch mit dem Oligonukleotid der Hybridisierungskontrolle sein und trägt zusätzlich beispielsweise eine Markierung am 3'-Ende, z.B. Digoxigenin, Biotin, radioaktive Markierungen, wie z. B.  $^{33}\text{P}$ , oder Fluoreszenzfarbstoffe, um auch ohne erfolgter Hybridisierung ein gut auswertbares Signal zu liefern. Die Orientierungskontrolle ist vorzugsweise in zwei Kontrollbereichen 4 angeordnet, die an bestimmten, z.B. während der Auftragung dieser Oligonukleotide, vordefinierbaren Stellen des Trägers 1 angeordnet sein können.

25 Die Oligonukleotide für die Kontrollbereiche 4 und für die Analysebereiche 3 können in mehreren Bereichen der Vorrichtung angeordnet sein, beispielsweise an zumindest 2 Bereichen, aber auch an 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 oder 10 Bereichen.

30 Durch die mehrfache Anordnung der gleichen Positivkontrollen, sowohl in unterschiedlichen als auch in gleichen Konzentrationen kann eine Normierung innerhalb einer bzw. auch zwischen verschiedenen Messungen durchgeführt werden. So können z. B. durch Berechnung eines Korrekturfaktors die Messungen in den Analysebereichen einer Vorrichtung mit der auf einer bzw. mehreren anderen Vorrichtungen miteinander verglichen werden. Es können selbstverständlich auch die Messungen in den Analysebereichen auf derselben Vorrichtung durch Berechnung eines Korrekturfaktors normiert werden. Um die Problematik zu umgehen, 35 daß man nur das Signal messen kann, man aber eigentlich nur an der Analytkonzentration

interessiert ist wird im folgenden ein Berechnungsbeispiel, wobei die Analytkonzentration durch eine Kalibrationsfunktion mit der Signalstärke verbunden ist, in vereinfachter Form dargestellt.

- 5 Ein zusätzliches Signal kann von einem Kreuzreaktanten stammen. Daraus folgt:  $\text{Signal (Analyt)} = \text{Kalibrationsfunktion [Analytkonzentration]} + \text{Signal(Kreuzreaktanten)}$ . Das Signal einer Kreuzreaktion bezieht sich immer auf den gegebenen Analyten und kann sogar von mehreren Kreuzreaktanten stammen.
- 10 Ein einfaches additives Modell bestimmt, daß  $(\text{Signal der Kreuzreaktanten für den Analyt } a) = \text{Summe } [K_{ai} * \text{Signal(Kreuzreaktant } i)]$ , wobei  $K_{ai}$  ein Selektivitätskoeffizient, der angibt in welchem Maße der Kreuzreaktant  $i$ , zum Signal des Analyten  $a$  beiträgt, ist. Dieser Koeffizient muß für jede Kombination von Analyten neu festgelegt werden.
- 15 Wenn man nun in erster Näherung eine einfache lineare Kalibrationsfunktion annimmt und Kreuzreaktanten vernachlässigt, ergibt sich folgende Gleichung:  $\text{Signal (Analyt)} = K * \text{Analytkonzentration} + \text{Offset}$ . Der Faktor  $K$  setzt sich aus einer Menge von Faktoren zusammen, die von den einzelnen Analyseschritten herführen, wie z.B.  $K = \text{Isolationseffizienz} * \text{PCR-Effizienz} * \text{Hybridisierungseffizienz} * \text{Labelingeffizienz} * \text{Signal-Amplifikationsausbeute} * \text{Printqualität} * \text{Meßfunktion}$
- 20

- Im Gegensatz dazu hofft man bei Genexpressionsexperimenten durch die Verhältnisbildung von zwei unter gleichen Bedingungen durchgeführten Analysen die Unterschiede, die sich durch die unterschiedlichen Effizienzen der einzelnen Schritte ergeben, zu kompensieren, wie
- 25 z.B.  $\text{Signal (Analyt (A))} / (\text{Analyt (B)}) = [K * \text{Analytkonzentration (A)}] / [K * \text{Analytkonzentration (B)}] = \text{Analytkonzentration(A)} / \text{Analytkonzentration(B)}$ .

- Es hat sich aber in der Praxis gezeigt, daß sich so nicht alle Unterschiede kompensieren lassen. Durch die Bestimmung der Effizienz der einzelnen Schritte lassen sich komplexere Modelle erstellen, wodurch auch bei Genexpressionsexperimenten eine Verbesserung in der
- 30 Normierung bzw. Quantifizierung möglich wird.

Da bei der Anwendung von Microarrays in der Genotypisierung keine Referenzproben vorliegen, ist die Kontrolle der einzelnen Schritte von größter Bedeutung.

Es können Oligonukleotide, wie z. B. die Orientierungskontrolle und/oder die PCR-Kontrolle und/oder Orientierungskontrolle im selben Analyse- bzw. Kontrollbereich 3,4, wie die Ziel-nukleinsäuresequenz vorliegen und durch ihre unterschiedliche Markierung wie z. B. verschiedene Farbstoffderivate, während der Detektion unterschieden werden.

5

Die Oligonukleotide werden mit Nukleinsäuresequenzen der Zielsequenz hybridisiert und erzeugen in der Folge ein Signal. Da vorzugsweise eine Oligonukleotidsequenz in mehreren Bereichen auf der Vorrichtung angeordnet ist, werden vorzugsweise und nur jene hybridisierten Oligonukleotide als positiv gewertet, für die mehr als ein Signal beobachtet werden kann, wo-  
10 durch die Sicherheit und die Reproduzierbarkeit des Ergebnisses verbessert werden kann.

Die Negativkontrolle ist ein Kontrollbereich 4 auf der Oberfläche 2 des Trägers 1, an den kein Oligonukleotid gebunden ist. Dies ermöglicht unspezifische Adhäsionen diverser Nukleinsäuresequenzen zu detektieren.

15

Die Oligonukleotide der Analysebereiche 3 und/oder Kontrollbereiche 4 werden vor dem Auftragen auf den Träger 1 mit der Hybridisierungskontrolle in einem bestimmten Verhältnis vermischt. Das Verhältnis der Oligonukleotide zu der Hybridisierungskontrolle kann in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:100 liegen. Vorteilhaft hat sich das Mischungsverhältnis von 1:10 erwiesen. Die Hybridisierungskontrolle dient als Kontrolle der erfolgten Hybridisierung für  
20 jeden einzelnen Analyse- und/oder Kontrollbereich 4. Falsch negative Ergebnisse können mittels der Hybridisierungskontrolle ausgeschlossen werden. Zur Unterscheidung bei der späteren Detektion kann beispielsweise die Zielnukleinsäuresequenz mit einem anderen Farbstoffderivat markiert sein als die Hybridisierungssondensequenz, und daher kann bei der Aus-  
25 wertung das Signal der Zielnukleinsäuresequenz vom Signal der Hybridisierungssonde durch z. B. eine andere Farbe unterschieden werden. Die Hybridisierungssonde ist eine Nukleinsäuresequenz komplementär zur Hybridisierungskontrolle und kann beispielsweise mit verschiedenen Farbstoffderivaten wie beispielsweise Cy1, Cy 2, Cy 3, Cy 4 und/oder Cy 5 markiert sein. Von Vorteil ist dabei auch, daß bei fehlender Hybridisierung mit einer komplementären Zielnukleinsäuresequenz ein Signal, nämlich das der Hybridisierungssonde detektiert  
30 werden kann, wodurch festgestellt werden kann, daß das fehlende Signal nicht aufgrund eines Analyseverfahrensfehlers zustande gekommen ist.

35

Nach erfolgter Anbringung der Oligonukleotide in den Kontroll- bzw. Analysebereichen 3,4 werden die nicht gebundenen Oligonukleotide vom Träger 1 entfernt. Die nicht gebundenen



- 23 -

Oligonukleotide können durch Waschen des Trägers 1 in einer SDS-Lösung mit einer Konzentrationen im Bereich von 0,01 % bis 2 %, insbesondere im Bereich von 0,1 % bis 1 %, vorzugsweise in einer Konzentration von 0,2 %, entfernt werden. Das auf der Oberfläche 2 des Trägers 1 verbleibende Detergens wird mit einer Waschflüssigkeit, wie z. B. Wasser, PBS, TE, etc. entfernt. Der Träger 1 wird mit Luft getrocknet und in eine Flüssigkeit, wie z. B. Wasser, NaCl, vorzugsweise Ethanol und/oder PBS, getaucht. Wasserstoffabgebende Reagenzien wie z.B. LiAlH<sub>4</sub>, Na BH<sub>4</sub>, etc. werden der Lösung in einer Menge von 0,001 g bis 0,5 g, insbesondere 0,01 g bis 0,25 g, vorzugsweise 0,01 g bis 0,1 g in einem Volumen von 500 ml, vorzugsweise 100 ml, insbesondere 50 ml, zugesetzt. Als vorteilhaft hat sich ein Volumen von 40 ml, insbesondere 30 ml, erwiesen. Die unterschiedlichen Waschschr

Im folgenden sind DNA Sequenzen von möglichen Oligonukleotiden der Zielnukleinsäuresequenzen bzw. der Positivkontrollen von 5' nach 3' aufgelistet:

Zielorganismus: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

SEQ ID No 3 TCGATTTGGGGATTGGGGTTTAGCCCTGGTGCC

Zielorganismus: *Actinomyces odontolyticus*

SEQ ID No 4 GGCACTAGGTGTGGGGGCCACCCGTGGTTTCTG

Zielorganismus: *Actinomyces viscosus*

SEQ ID No 5 GGCACTAGGTGTGGGGGGCCTTTTCCGGGTCTT

Zielorganismus: *Bacteroides forsythus*

SEQ ID No 6 ATTACTAGGAGTTTGCGATATAGTGTAAAGCTCT

Zielorganismus: *Campylobacter concisus*

SEQ ID No 7 TATACTAGTTGTTGCTAAGCTAGTCTTGGCAGT

- 24 -

Zielorganismus: *Campylobacter gracilis* (*Bacteroides gracilis*)

SEQ ID No 8 TATACCGGTTGTTGCTGTGCTAGTCACGGCAGT

5 Zielorganismus: *Campylobacter rectus*

SEQ ID No 9 TATACTAGTTGTTGCTTCGCTAGTCGAGGCAGT

Zielorganismus: *Capnocytophaga gingivalis*

10

SEQ ID No 10 GATACTAGCTGTTTGGCGCAAGCTGAGTGGCTA

Zielorganismus: *Eikenella corrodens*

15 SEQ ID No 11 TCGATTAGCTGTTGGGCAACTTGATTGCTTAGT

Zielorganismus: *Eubacterium nodatum*

SEQ ID No 12 AGCACTAGGTGTCGGGCTCGCAAGAGTTCGGTG

20

Zielorganismus: *Fusobacterium nucleatum*

SEQ ID No 13 ATTACTAGGTGTTGGGGGTCGAACCTCAGCGCC

25 Zielorganismus: *Peptostreptococcus micros*

SEQ ID No 14 AGTGCTAGGTGTTGGGAGTCAAATCTCGGTGCC

Zielorganismus: *Porphyromonas gingivalis*

30

SEQ ID No 15 ATTACTAGGAGTTTGCGATATACCGTCAAGCTT

Zielorganismus: *Prevotella intermedia*

35 SEQ ID No 16 GATGCCCGCTGTTAGCGCCTHGCCTAGCGGCT

- 25 -

Zielorganismus: *Prevotella nigrescens*

SEQ ID No 17      GATGCCCCGCGTTGGCCCTGCCTGCGGCCAAGC

5      Zielorganismus: *Streptococcus constellatus*

SEQ ID No 18      AGTGCTAGGTGTTAGGTCCTTTCCGGGACTTAG

Zielorganismus: *Streptococcus gordonii*

10

SEQ ID No 19      AGTGCTAGGTGTTAGGCCCTTTCCGGGGCTTAG

Zielorganismus: *Streptococcus mitis*

15      SEQ ID No 20      AGTGCTAGGTGTTAGACCCTTTCCGGGGTTTAG

Zielorganismus: *Treponema denticola*

SEQ ID No 21      TACACTAGGTGTCGGGGCAAGAGCTTCGGTGCC

20

Zielorganismus: *Veillonella parvula*

SEQ ID No 22      GGTACTAGGTGTAGGAGGTATCGACCCCTTCTG

25      PCR-Kontrolle

SEQ ID No 23      TCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCT

Hybridisierungs- und Orientierungskontrolle

30

SEQ ID No 24      ACGTCAGCCACCATTACATCCGGTGAGCAGTCA

Hybridisierungssonde

35      SEQ ID No 25      GACTGCTCACCGGATGTAATGG

Zur Hybridisierung können einzelsträngige Nukleinsäuren verwendet werden, die entweder durch Denaturierung aus doppelsträngigen Nukleinsäuresequenzen gewonnen werden oder bereits einzelsträngig vorliegende Nukleinsäuresequenzen, vorteilhafterweise durch Amplifikation mit einem Primergradienten, entstanden sind. Der Primergradient kann ein Verhältnis des Vorwärtsprimers zum Rückwärtsprimer von 1:100, vorzugsweise 1:50, insbesondere 1:10, darstellen und führt zu einer asymmetrischen PCR. Ist nämlich während der Amplifikation der Zielnukleinsäuresequenz nur mehr ein Primer vorhanden kommt es zur Herstellung einzelsträngiger DNA Moleküle, die dann für die Hybridisierung am DNA Chip zur Verfügung stehen.

Die Zielnukleinsäuresequenz ist DNA oder RNA isoliert aus einer biologischen Probe, wie z. B. Bakterienzellen, Viren oder auch Eukaryontenzellen. Es können sowohl Gewebeproben (Blutzellen, Biopsien, etc.) als auch Flüssigkeitsproben (Blut, Speichel, Harn, Pleura- oder Peritonealflüssigkeit, etc.) verwendet werden. Zur Isolierung der Nukleinsäure können sämtliche zur Verfügung stehende Methoden verwendet werden. Es ist oft wünschenswert die Zielnukleinsäuresequenz vor der Hybridisierung zu amplifizieren.

Zur Analyse bzw. Identifikation von oben angeführten Bakterienarten wurden nach der Erfindung spezielle, neue Oligonukleotidprimer von zumindest 15 Basenpaaren Länge, welche dadurch charakterisiert sind, daß sie in neu definierten Konsensussequenzen für das 16S-rRNA Gen der amplifizierten Zielnukleinsäuresequenzen hybridisieren, verwendet.

Die DNA Sequenzen dieser Primer umfassen zumindest 15 Nukleotide der unten von 5' nach 3' aufgelisteten Sequenzen.

Vorwärtsprimer

SEQ ID No 1 GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG

Rückwärtsprimer

SEQ ID No 2 CCCAACAYYTCACGACACGAGCTGACGACAGCCAT

Die Sequenzen der Primer und Oligonukleotide, welche hier angeführt werden, sind im Standard IUB/IUPC Nukleinsäurecode angegeben. Der oben angeführte Rückwärtsprimer enthält

das Symbol Y. In Übereinstimmung mit der Standardterminologie für die Verwendung von degenerierten Sequenzen steht Y für C und T. Y zeigt Nukleotidpermutationen in „Wobble“ Regionen der Sequenzen an. Der Rückwärtsprimer wird daher als degeneriertes Primersset mit C und T als geeignete Nukleotide für die Inkorporation in den Wobbleregionen zur Verfügung  
5 gestellt.

Die Primer, insbesondere der Rückwärtsprimer, sind für die Signaldetektion markiert. Diese Markierungen können z. B. Digoxigenin, Biotin, radioaktive Markierungen, wie z.B. <sup>33</sup>P, Floureszenzfarbstoffe wie Cy 1, Cy 2, Cy 3, Cy 4, und/oder Cy 5, etc. oder Kombination dar-  
10 aus sein. Auch jedes andere Markierungssystem kann verwendet werden. Dies trifft selbstverständlich auch für sämtliche in dieser Beschreibung genannten Markierungen zu. Es können beispielsweise auch die für die Amplifikation verwendeten Nukleotide bereits markiert sein. Selbstverständlich können auch die Oligonukleotide am Träger 1 mit Digoxigenin, Biotin, radioaktiven Markierungen, wie z.B. <sup>33</sup>P, Floureszenzfarbstoffen, etc. markiert werden. Der  
15 markierte Rückwärtsprimer ist somit Bestandteil jedes doppelsträngigen als auch durch die asymmetrische PCR entstandenen einzelsträngigen Amplifikate.

Mit diesen Primern können sowohl Nukleotidsequenzen gramnegativer als auch grampositiver Bakterien amplifiziert werden. Die amplifizierten Nukleinsäuresequenzen können direkt  
20 für die Hybridisierung verwendet werden, wodurch Reinigungsschritte eingespart werden können.

Die Oligonukleotide am Träger 1 bilden mit der, insbesondere amplifizierten, Zielsequenz stabile Hybridduplex durch komplementäre Basenpaarung. Um eine gleichmässige und spezi-  
25 fische Hybridisierung am Träger 1 zu erzielen, kann der Träger 1 über eine Zeitperiode ausgewählt aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 1 Minute, insbesondere 2 Minuten und einer oberen Grenze von 30 Minuten, insbesondere 20 Minuten, vorzugsweise 5 Minuten, bei einer Temperatur, ausgewählt aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 20 °C, insbesondere 30 °C, und einer oberen Grenze von 95 °C, insbesondere 75 °C, vorzugsweise bei  
30 60 °C, vorinkubiert werden. Die markierten Amplifikationsprodukte können in verschiedenen Volumina ausgewählt aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,5 µl, insbesondere 1 µl, und einer oberen Grenze von 20 µl, insbesondere 15 µl, vorzugsweise in einem Volumen von 5 µl für die Hybridisierung in einer Lösung, bestehend aus Natriumcitrat und/oder NaCl, verwendet werden. Die auf den Träger 1 aufgebrachte Lösung mit den Amplifikaten kann, z.  
35 B. mit Wachs, Öl, Glasplättchen etc., überschichtet werden um gleichmässige Bedingungen,

- 28 -

- wie beispielsweise eine konstante Temperatur und/oder eine konstante Luftfeuchtigkeit, aufrecht zu erhalten. Die Inkubation kann bei Temperaturen in einem Bereich von 20 °C bis 75 °C, insbesondere von 30 °C bis 70 °C, und vorzugsweise bei 50 °C bis 60 °C für eine Zeitperiode von 1 Minute bis 4 Stunden, beispielsweise 3 Minuten bis 3 Stunden, vorzugsweise von 5 Minuten bis 1 Stunde, und insbesondere von 10 Minuten bis 15 Minuten, durchgeführt werden. Die Nukleinsäuresequenzen, die keine Hybridduplex bilden werden unter stringenten Bedingungen gewaschen und die hybridisierten Nukleinsäuresequenzen, die analysiert werden, bleiben auf dem Träger 1.
- 10 Nukleinsäuren werden durch Erhöhung der Temperatur oder Erniedrigung der Salzkonzentration des Puffers denaturiert. Unter niedrig stringenten Bedingungen, wie niedrige Temperatur und hohe Salzkonzentration, bilden sich sogar Duplex, welche keine exakt komplementäre Sequenz haben. Dadurch wird die Spezifität der Hybridisierung unter niedrig stringenten Bedingungen reduziert. Unter hoch stringenten Bedingungen, wie hoher Temperatur und niedriger Salzkonzentration im Puffer, wird die Spezifität der Hybridisierung erhöht. Das Entfernen der nicht gebundenen Zielsequenzen kann mit einer Lösung, bestehend aus Natriumcitrat und/oder NaCl in einem ersten Schritt bei Temperaturen von 40 °C bis 75 °C, insbesondere von 45 °C bis 70 °C und vorzugsweise bei 50 °C bis 60 °C erfolgen. In einem weiteren Schritt wird mit der gleichen Lösung bei Temperaturen ausgewählt aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 4 °C, insbesondere 8 °C, und einer oberen Grenze von 30 °C, insbesondere 20 °C gewaschen. Es können sowohl die Hybridisierung als auch die anschließenden Waschschritte unter gleichen, hoch stringenten Bedingungen erfolgen um eine hohe Spezifität und somit eindeutige Auswertbarkeit zu erzielen.
- 25 Die hybridisierten Nukleinsäuresequenzen können mittels der Markierung, die in die Zielnukleinsäuresequenzen und/oder in die Oligonukleotide eingebracht werden, detektiert werden. Vorzugsweise werden die Marker bereits während der Amplifikation in die Zielsequenz inkorporiert. Es können z. B. während der PCR markierte Primer oder markierte Nukleotide verwendet werden. Alternativ kann der Marker aber auch direkt an die Zielsequenz oder nach der Amplifikation angebracht werden, z. B. durch Nick-Translation oder End-Markierung, wie z. B. Kinasierung der Nukleinsäuresequenz und anschließende Ligation eines Linkers, der die Nukleinsäuresequenz mit dem Marker verbindet. Markierungen können mit spektroskopischen, photochemischen, biochemischen, immunchemischen, elektrischen, optischen, chemischen oder dgl. Methoden detektiert werden.

Die Auswertung des Trägers 1 kann, z.B. durch Intensitätsmessung einer bestimmten Lichtwellenlänge nach Anregung eines fluoreszierenden Moleküls mit zumindest annähernd, bevorzugt mittels eines Lasers erzeugten, monochromatischem Licht erfolgen. Bei dieser Messung können die Ortsdaten (Koordinaten), wie die Lokalisation und die Grenzen des Lesefeldes auch mittels der Oligonukleotide für die Orientierungskontrolle am eingelesenen Träger 1 mit den gemessenen Intensitäten je nach Wellenlänge koordiniert werden. Das verwendete Lesegerät ist mit zwei unterschiedlichen Lasern ausgerüstet. Die Laser und die Photomultiplier sind für die verwendeten Farbstoffderivate Cy3 und Cy5 abgestimmt. Die Bedienung und softwaremässige Erfassung ist Teil der Gerätebedienung. Das Ergebnis der Hybridisierung ergibt sich durch die Abfrage der mit dem Lesegerät gemessenen Lichtintensitäten in den Analyse- bzw. Kontrollbereichen 3,4.

Abhängig von der Markierung der spezifischen Bindungspartner bzw. des Analyten können auch optische, elektrische, elektrochemische, magnetische, photochemische, photoelektrische oder enzymatische Detektions- bzw. Meßmethoden verwendet werden. Diese Methoden können selbstverständlich auch miteinander kombiniert werden. Beispielsweise können mittels der Oberflächenplasmonresonanztechnologie auch unmarkierte Bindungspartner bzw. Analyten nachgewiesen werden.

## 20 Ausführungsbeispiel

Im folgenden wird die Herstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung in Form eines DNA-Chips beschrieben. Die Präparation des DNA-Chip-Rohlings des Trägers 1 erfolgt bei Raumtemperatur. Alle aufzubringenden Oligonukleotide werden in einer Masterplatte in 150 µl Portionen für den Nanoplotter bereitgestellt. Gleichzeitig dient diese Masterplatte der Lagerung. Alle DNA Oligonukleotide sind in 10 % DMSO gelöst. Es werden pro Spot (Ort der Sonden Platzierung am DNA Chip) 350 pl je Oligonukleotid aufgebracht. Der dabei entstandene Spot formt eine Kreisfläche mit 300 µm Durchmesser und enthält etwa 10 fmol Oligonukleotid für die Analysebereiche 3 bzw. die 1 fmol Oligonukleotid für die Kontrollbereiche 4. Die Orientierungskontrolle wird in einer Konzentration von 100 µM, die Hybridisierungskontrolle in einer Konzentration von 0,8 µM bis 80 µM und die PCR Kontrolle in einer Konzentration von 0,1 nM bis 100 µM aufgebracht. In die Analysebereiche 3 werden der Oligonukleotide komplementär zu den Zielsequenzen in der Konzentration von 100 µM des entsprechenden Oligonukleotids und 0,5 µM der Hybridisierungskontrolle aufgetragen. Überschüssige Oligonukleotide werden vom DNA Chip durch 5 Minuten Waschen (eintauchen

gefolgt von kurzem Schwenken) in 0,1 % SDS bei 60 °C. Unmittelbar danach wird der DNA Chip für 5 Minuten in 94 °C warmes H<sub>2</sub>O getaucht. Nach Entfernen von etwaigen Wassertropfen mittels Luftspray wird der DNA Chip bei Raumtemperatur vollständig getrocknet. Ein fünf Minuten lang dauerndes Tauchbad in 0,01 g NaBH<sub>4</sub> pro 40 ml PBS und 20 ml Ethanol vervollständigt den Vorgang der kovalenten Bindung der Oligonukleotide am Chip und deaktiviert unbenutzte reaktive Gruppen. Der DNA Chip wird vor der Lagerung nochmals für 10 Sekunden in 95 °C warmes H<sub>2</sub>O getaucht und mit Druckluft getrocknet. Die Lagerung erfolgt lichtgeschützt bei 4 °C.

Im folgenden wird ein Beispiel für eine mögliche Anordnung der Oligonukleotide aufgezeigt. Es können aber auch beliebig anders gewählte Anordnungsvarianten für das Design des DNA Chips verwendet werden.

Die Oligonukleotide für die Positivkontrolle zur Bestimmung der Orientierung des Trägers 1 können beispielsweise an den Kreuzungspunkten der ersten Spalte mit der ersten und letzten Reihe und am Kreuzungspunkt der letzten Spalte mit der letzten Reihe angeordnet sein. Die Oligonukleotide für Positivkontrollen zur Hybridisierung können beispielsweise in absteigender Konzentration in der ersten Spalte am Kreuzungspunkt mit der zweiten Reihe beginnend bis zur vorletzten Reihe, angeordnet sein. Die Oligonukleotide für die Positivkontrolle zur Bestimmung der Qualität der PCR können beispielsweise in aufsteigender Konzentration am Kreuzungspunkt der ersten Reihe mit der zweiten Spalte beginnend bis zur letzten Spalte, angeordnet sein. Die Negativkontrolle kann, beispielsweise beginnend am dem Kreuzungspunkt der letzten Reihe mit der zweiten Spalte bis zur letzten Spalte, angeordnet sein. Die Oligonukleotide komplementär zur Zielsequenz sind beispielsweise alternierend in jedem zweiten Analysebereich 3 angeordnet. Die Analysebereiche 3 erstrecken sich beispielsweise vom Kreuzungspunkt der zweiten Reihe mit der zweiten Spalte bis zum Kreuzungspunkt der vorletzten Reihe mit der letzten Spalte. Die Oligonukleotide gleicher Nukleotidsequenz, welche komplementär zur Zielsequenz sind, kommen mit bis zu drei Wiederholungen in verschiedenen Analysebereichen 3 vor.

30

#### DNA Extraktion

Aus klinischen Proben wird die totale DNA isoliert. Dies geschieht unter Verwendung von kommerziell angebotenen Kits (z. B. QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) entsprechend den Herstelleranweisungen folgend.

35



## PCR Amplifikation

Die Amplifikation der Zielnukleinsäuresequenzen kann wie folgend als Durchführungsbeispiel beschrieben, durchgeführt werden. 1/10 bis 1/1000 der total präparierten DNA werden  
5 amplifiziert. Dazu werden 2 µl 10fach PCR Puffer (100 mM Tris-HCl; pH 8,3; 500mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,01% Gelatine; Sigma), 2 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma); 0,2 µl dNTP's Mix (25 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP), Vorwärtsprimer zu einer Endkonzentration von 0,05 µM und Rückwärtsprimer zu 0,5 µM zugegeben. Zusätzlich wird Escherichia coli DNA mit einer Endkonzentration von 10000 Kopien/20 µl und 1 Unit Taq Polymerase (Sigma) zu-  
10 gesetzt und mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 19,5 µl aufgefüllt. Die DNA, gelöst in einem Volumen von 0,5 µl wird zuletzt dem Reaktionsmix zugesetzt. Die Amplifikation erfolgt in einem Thermocycler der Firma Perkin Elmer (Gene Amp® PCR System 9700). Es werden 0,2 ml MicroAmp® Reaktionsröhrchen verwendet. Die für die Amplifikation nötigen Temperaturschritte laufen wie folgt ab. Der erste Schritt ist eine 5 Minuten lange Denaturierungsphase mit 94 °C, dann folgen 30 Zyklen mit 40 Sekunden bei 94 °C, 60 Sekunden bei 62 °C und 40 Sekunden bei 72°C. Den Zyklen folgt eine Extensionsphase mit 5 Minuten bei 72 °C. Es entsteht ein Amplifikationsprodukt von ungefähr 300 Basenpaaren, abhängig von der Sequenz der jeweilig amplifizierten Bakterienart. Die Amplifikationsbeschreibung ist nicht beschränkend zu sehen, und es können selbstverständlich auch alternative Amplifikationsbedingungen gewählt werden. Das Amplifikat wird direkt zur Hybridisierung eingesetzt oder  
20 vorher unter Verwendung von kommerziell angebotenen Kits (z. B. QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) entsprechend den Herstelleranweisungen folgend, gereinigt.

## Hybridisierung

25 Um eine gleichmässige und spezifische Hybridisierung am DNA Chip zu gewährleisten wird der DNA Chip für die Hybridisierung wie folgt vorbehandelt. Es erfolgt 10 Minuten eine Vorinkubation bei 80 °C und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Bei Raumtemperatur werden innerhalb dieser Zeit 10 µl der Hybridisierungslösung (1fach SSC (150 mM Natriumchlorid, 15 mM Natriumcitrat, pH 7) und 10 fmol/µl Hybridisierungssonde) mit 10 µl PCR Amplifikat in einem DNase-freien Reaktionsgefäß gemischt. Nach Ablauf der Vorinkubationszeit wird das Hybridisierungsgemisch in das Hybridisierungsareal am Chip pipettiert und unverzüglich mit einem Deckglas bedeckt. Die Hybridisierung erfolgt während einer 20 Minuten langen Inkubation bei 50 °C und gesättigter Luftfeuchtigkeit.

### Detektion

Nach erfolgter Hybridisierung wird das Deckglas entfernt und der DNA Chip unverzüglich in eine Waschlösung (1x SSC (150 mM Natriumchlorid, 15 mM Natriumcitrat, pH 7) getaucht.

- 5 Nach kurzem Schwenken folgt 2 Minuten die Inkubation bei 40 °C. Der Waschvorgang erfolgt weitere 3 Mal bei Raumtemperatur. Mit Druckluft werden etwaige Flüssigkeitsrückstände von der Chip Oberfläche entfernt. Der trockene DNA Chip kann lichtgeschützt bei Raumtemperatur einige Tage bis zur Auswertung mit dem Lesegerät gelagert werden. Der DNA Chip wird in den Scanner (Genepix 4000A von Axon Instrument) eingelegt und durch  
10 Anregung der Cy3 und Cy5 Farbstoffmoleküle mit monochromatischem Licht gemessen.

Dieses Ausführungsbeispiel ist nicht beschränkend zu sehen und es können selbstverständlich die darin angegebenen Reagenzien in Konzentrationen, ausgewählt aus den jeweiligen in der Beschreibung genannten Bereichen bzw. alternative Reagenzien hierzu, enthalten sein.

15

Der Ordnung halber sei abschließend darauf hingewiesen, daß zum besseren Verständnis des Aufbaus der Vorrichtung zur Analyse von Zielnukleinsäuresequenzen, diese bzw. deren Bestandteile teilweise unmaßstäblich und/oder vergrößert und/oder verkleinert dargestellt wurden.

20

Die den eigenständigen erfinderischen Lösungen zugrundeliegende Aufgabe kann der Beschreibung entnommen werden.

25

30

35

**Bezugszeichenaufstellung**

- 5      1    Träger  
      2    Oberfläche  
      3    Analysebereich  
      4    Kontrollbereich

10

15

20

25

30

35

40

45

50

### Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Analyse zumindest eines Analyten aus einer Probe umfassend einen Träger mit einer Oberfläche, auf welcher zumindest ein vordefinierbarer Analysebereich und  
5 zumindest ein vordefinierbarer Kontrollbereich angeordnet sind, wobei in dem vordefinierten Analysebereich zumindest ein erster Bindungspartner immobilisiert ist, der spezifisch an zumindest einen Analyten bindet, dadurch gekennzeichnet, daß in dem zumindest einen Kontrollbereich (4) zumindest ein weiterer Bindungspartner für zumindest eine Kontrolle zur Bestimmung der Qualität der Analyse immobilisiert ist.
- 10 2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger plättchenförmig, wie z.B. in Form eines Objektträgers, plättchenförmig mit Vertiefungen, wie z.B. in Form von Chamberslides, oder in Form einer Mikrotiterplatte nach Abmessungen gemäß den Empfehlungen der SBS (Society of Biomolecular Screening) ausgebildet ist.
- 15 3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der zumindest eine Analyt und/oder der spezifische Bindungspartner aus einer Gruppe umfassend Nukleinsäuren, wie z.B. DNA, RNA, PNA (Peptidnukleinsäuren), Proteine, wie z.B. Antikörper, Epitope, Antigene, Scaffold Proteine, Fusionsproteine, insbesondere rekombinante Fusionsproteine, Signalproteine, Transmitter, Enzyme, Substrate, Hormone, Peptide, Lipide, Kohlenhydrate, wie z.B. Mono-, Di-, Oligo- und Polysaccharide, und deren modifizierten Formen  
20 ausgewählt ist.
4. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die zumindest eine Kontrolle zur Bestimmung der Orientierung des Trägers (1) in einer Analysevorrichtung ausgebildet ist.
- 25 5. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die zumindest eine Kontrolle zum Nachweis der Bindung des zumindest einen Analyten an den ersten und/oder weiteren Bindungspartner ausgebildet ist.
- 30 6. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die zumindest eine Kontrolle zur Bestimmung der Qualität der Amplifikation, wie z.B. Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Ligase-Kettenreaktion (LCR), Transkription vermittelte Amplifikation (TMA), Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR), Q-beta Replikase Amplifizie-
- 35

rung, NASBA (nucleic acid sequence-based amplification), Einzelstrang-Displacement Amplifizierung oder Amplicon-Vektoren, ausgebildet ist.

7. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,  
5 daß die zumindest eine Kontrolle zum Nachweis des Ursprungs der Probe, aus welcher der Analyt nachgewiesen wird, und/oder des zumindest einen Analyten ausgebildet ist.
8. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,  
10 daß die zumindest eine Kontrolle zur Bestimmung von Kreuzreaktionen des zumindest einen Analyten mit einem weiteren Analyten und/oder dem zumindest ersten und/oder dem zum zumindest weiteren Bindungspartner ausgebildet ist.
9. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,  
15 daß die zumindest eine Kontrolle zum Nachweis von Kontaminationen der Probe, aus welcher der zumindest eine Analyt nachgewiesen wird, und/oder des zumindest einen Analyten ausgebildet ist.
10. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,  
20 daß die zumindest eine Kontrolle zum Nachweis der Effizienz der Isolierung des zumindest einen Analyten ausgebildet ist.
11. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,  
25 daß die zumindest eine Kontrolle zur Bestimmung der Intensitätsverstärkung des Detektionssignals ausgebildet ist.
12. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,  
daß die zumindest eine Kontrolle zur Bestimmung der Immobilisierungseffektivität des ersten und/oder weiteren Bindungspartners ausgebildet ist.
13. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,  
30 daß die zumindest eine Kontrolle zum Nachweis der Effizienz der Markierung des ersten und/oder weiteren Bindungspartners ausgebildet ist.
14. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,  
35 daß die zumindest eine Kontrolle zum Nachweis der Sensitivität und Linearität des Detekti-

- 36 -

onssysteme (Kalibration) ausgebildet ist.

15. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß auf dem Träger (1) in einem vorbestimmbaren Bereich der Oberfläche (2) zumindest eine
- 5 Negativkontrolle angeordnet ist.
16. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der zumindest eine Analyt und/oder die zumindest eine Kontrolle als Verdünnungsreihen mit unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen, wobei jeweils eine Konzentration der Ver-
- 10 dünnungsreihe in einem vorbestimmbaren Analyse- bzw. Kontrollbereich (3, 4) vorliegt.
17. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentrationen des zumindest einen Bindungspartners in der Verdünnungsreihe mit einem Faktor, ausgewählt aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 1,5, insbesondere
- 15 2, vorzugsweise 3, und einer oberen Grenze von 100, insbesondere 30, vorzugsweise mit einem Faktor 10 abnehmen.
18. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß jeweils eine vorbestimmbare Konzentration des zumindest einen Bindungspartners und/
- 20 oder des zumindest weiteren Bindungspartners mehrfach in unterschiedlichen Analysebereichen (3) bzw. Kontrollbereichen (4) auf dem Träger (1) vorliegen.
19. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Bindungspartner für die Analyten und daß zumindest ein weiterer Bindungspartner für die Kontrolle auf dem Träger (1) in Spalten und Reihen angeordnet sind, wobei insbesondere jeweils unterschiedliche Bindungspartner für die Analyten in nebeneinander liegenden Bereichen und die weiteren Bindungspartner für die Kontrollen in gleichen und/oder in verschiedenen Konzentrationen in nebeneinander liegenden Bereichen der Spalten und Reihen angeordnet sind.
- 30
20. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere der ersten Bindungspartner in mehreren Analysebereichen angeordnet sind, wobei die Bindungspartner spezifisch für zumindest ein mit Parodontitis, insbesondere Periodontitis, assoziiertes Bakterium ausgewählt sind.

- 37 -

21. Vorrichtung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß das mit Parodontitis, insbesondere Periodontitis, assoziierte Bakterium aus einer Gruppe umfassend *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Actinomyces odontolyticus*, *Actinomyces viscosus*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter concisus*, *Campylobacter gracilis* (*Bacteroides gracilis*), *Campylobacter rectus*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Eikenella corrodens*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Treponema denticola* oder *Veillonella parvula* ausgewählt ist.
- 10 22. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz der zumindest einen Positivkontrolle aus einer Gruppe von Sequenzen ausgewählt ist, die mit einer Nukleinsäuresequenz hybridisierbar ist, die mittels zumindest einem Oligonukleotidprimer bestehend aus der DNA-Sequenz
- 15 5'-AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC - 3' und/oder einem Oligonukleotidprimer bestehend aus der DNA-Sequenz 5'- CAYYTCACGACACGAGCTGACGACA - 3' und/oder einem Oligonukleotidprimer bestehend aus zumindest 15 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der DNA-Sequenz 5'- GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG - 3' und/oder einem Oligonukleotidprimer bestehend aus zumindest 15 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der DNA-Sequenz
- 20 5'- CCCAACAYYTCACGACACGAGCTGACGACAGCCAT - 3' amplifizierbar ist.
23. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Zielnukleinsäuresequenz aus Sequenzen ausgewählt ist, die mit zumindest einem Oligonukleotidprimer bestehend aus der DNA-Sequenz
- 25 5'-AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC - 3' und/oder einem Oligonukleotidprimer bestehend aus der DNA-Sequenz 5'- CAYYTCACGACACGAGCTGACGACA - 3' und/oder einem Oligonukleotidprimer bestehend aus zumindest 15 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der DNA-Sequenz 5'- GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG - 3' und/oder einem Oligonukleotidprimer bestehend aus zumindest 15 aufeinanderfolgenden
- 30 Nukleotiden der DNA-Sequenz
- 5'- CCCAACAYYTCACGACACGAGCTGACGACAGCCAT - 3' amplifizierbar ist.
24. Verfahren zur Amplifikation von zumindest einer Zielnukleinsäuresequenz, insbesondere mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Ligase-Kettenreaktion (LCR), Transkription vermittelte Amplifikation (TMA), Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR), Q-beta Repli-
- 35

kase Amplifizierung, Einzelstrang-Displacement Amplifizierung oder Amplicon-Vektoren, dadurch gekennzeichnet, daß zur Amplifikation zumindest ein Oligonukleotidprimer bestehend aus der DNA-Sequenz 5'- AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC - 3' und/oder ein Oligonukleotidprimer bestehend aus der DNA-Sequenz

- 5 5'- CAYYTCACGACACGAGCTGACGACA - 3' und/oder ein Oligonukleotidprimer bestehend aus zumindest 15 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der DNA-Sequenz 5'- GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG - 3' und/oder ein Oligonukleotidprimer bestehend aus zumindest 15 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der DNA-Sequenz 5'- CCCAACAYYTCACGACACGAGCTGACGACAGCCAT - 3' verwendet wird.

10

25. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Zielnukleinsäuresequenzen für verschiedene Bakterienarten gleichzeitig amplifiziert werden.

15

26. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß eine Zielnukleinsäuresequenz des Gens für eine 16S-rRNA der Bakterienarten oder Teilsequenzen daraus amplifiziert werden.

20

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß für die Amplifikation Digoxigenin-, Biotin-, radioaktive Markierungen, wie z. B. <sup>33</sup>P, Fluoreszenzfarbstoff-markierte Oligonukleotidprimer bzw. Nukleotide und/oder Markierungen, die mit optischen, elektrischen, elektrochemischen, magnetischen, photochemischen, photoelektrischen oder enzymatischen Detektionsverfahren nachgewiesen werden, verwendet werden.

25

28. Verfahren zur Identifikation von zumindest einer Zielnukleinsäuresequenz umfassend die Schritte Probenaufbereitung, Amplifikation, Markierung, Hybridisierung komplementärer Sequenzen an ein Oligonukleotid und Detektion des Hybridisierungssignals, dadurch gekennzeichnet, daß Amplifikate erzeugt werden, die mittels einer Amplifikation mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 15 hergestellt werden.

30

29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikate an zumindest ein Oligonukleotid für zumindest eine Positivkontrolle und zumindest eine Zielnukleinsäuresequenz auf demselben Träger binden.

35

30. Oligonukleotidprimer mit einer Nukleinsäuresequenz, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuresequenz eine DNA-Sequenz aus einer Gruppe bestehend aus den Se-



- 39 -

sequenzen 5'-AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC - 3',

5'- CAYYTCACGACACGAGCTGACGACA - 3', aus zumindest 15 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der DNA-Sequenz

5'- GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG - 3' oder aus zumindest 15 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der DNA-Sequenz

5'- CCCAACAYYTCACGACACGAGCTGACGACAGCCAT - 3' umfaßt.

31. Analysekit umfassend eine Vorrichtung zur Analyse und zumindest einen Oligonukleotidprimer zur Amplifikation von zumindest einer Zielnukleinsäuresequenz, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 23 und/oder der Oligonukleotidprimer nach Anspruch 30 gebildet ist.

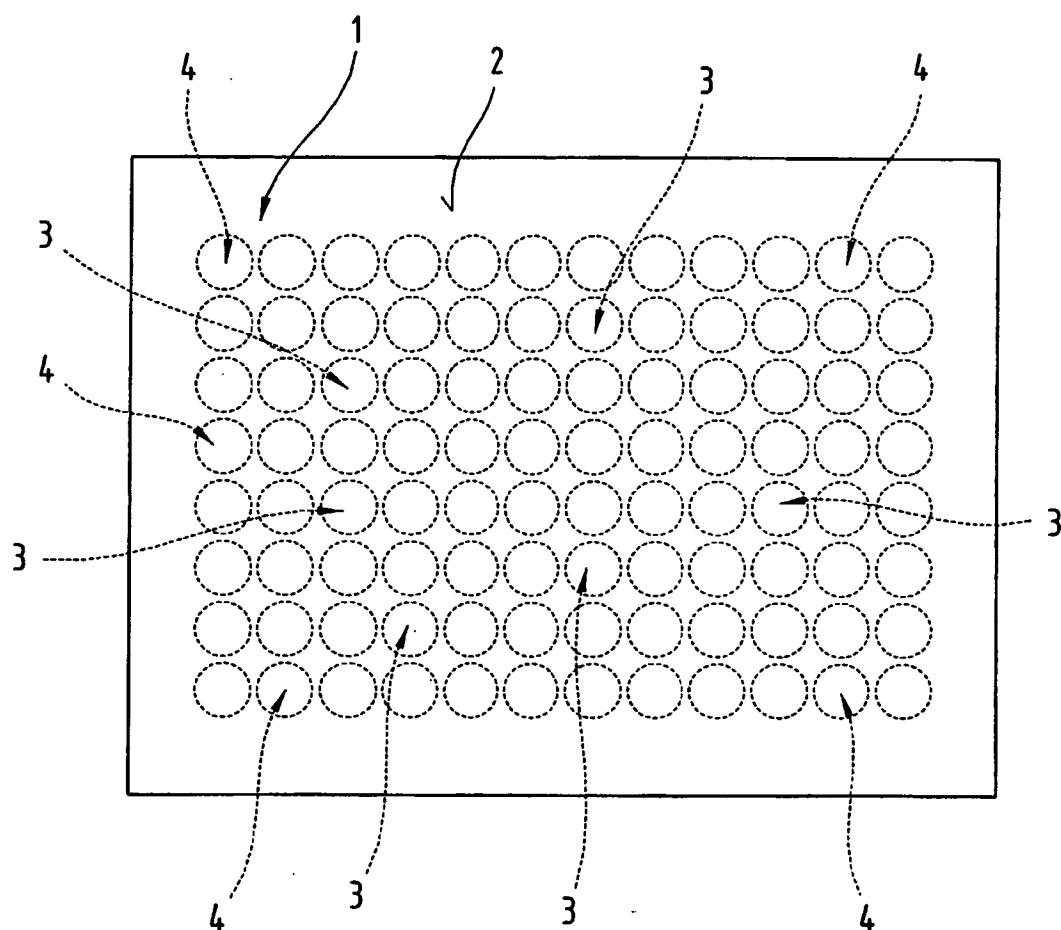
32. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 23 für die Identifikation von Analyten.

33. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 23 für die Identifikation von Analyten von mit Parodontitis assoziierten Bakterienarten und/oder für die Identifikation von Analyten zum Nachweis von Genexpressionsmustern und/oder für die Identifikation von Analyten zum Nachweis von Single Nucleotide Polymorphism (SNPs).

34. Verwendung des Analysekits nach Anspruch 31 für die Identifikation von Analyten.

35. Verwendung des Analysekits nach Anspruch 31 für die Identifikation von Analyten von mit Parodontitis assoziierten Bakterienarten und/oder für die Identifikation von Analyten zum Nachweis von Genexpressionsmustern und/oder für die Identifikation von Analyten zum Nachweis von Single Nucleotide Polymorphism (SNPs).

### Fig.1



## Sequenzprotokoll

<110> Lambda GmbH

Labor für molekularbiologische DNA-Analysen GmbH

Industriestrasse 6

4240 Freistadt

<120> Vorrichtung zur Analyse von Nukleinsäuren

<150> AT 1247/2001

<151> 2001-08-09

<160> 25

<210> 1

<211> 37

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 1

ggggagcaaa caggattaga taccctggta gtccacg

<210> 2

<211> 35

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 2

cccaacayyt cagcacaga gctgacgaca gccat

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 3

tcgatttggg gattgggggt tagccctggt gcc

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 4

ggcactaggt gtggggggcca cccgtggtt ctg

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 5

ggcactaggt gtggggggcc tttccgggt ctt

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 6

attactagga gtttgcgata tagtgaagc tct

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 7

tatactagtt gttgctaagc tagtcttggc agt

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 8

tataccgggt gttgctgtgc tagtcacggc agt

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 9

tatactagtt gttgcttcgc tagtcgaggc agt

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 10

gatactagct gttggcgca agctgagtgg cta

<210> 11

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 11

tcgattagct gttgggcaac ttgattgctt agt

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 12

agcactaggt gtcgggctcg caagagttcg gtg

<210> 13

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 13

attactaggt gttgggggtc gaacctcagc gcc

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 14

agtgctaggt gttgggagtc aaatctcggt gcc

<210> 15

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 15

attactagga gtttgcgata taccgtcaag ctt

<210> 16

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 16

gatgcccgcct gtttagcgctt hgcgctagcg gct

<210> 17

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 17

gatgcccgcc gttggccctg cctgcggcca agc



<210> 18

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 18

agtgctaggt gttagtcct ttccgggact tag

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 19

agtgctaggt gttaggccct ttccggggct tag

<210> 20

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 20

agtgctaggt gttagaccct ttccgggggt tag

<210> 21

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 21

tacactaggt gtcggggcaa gagcttcggt gcc

<210> 22

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 22

ggtactaggt gtaggaggta tcgacccctt ctg

<210> 23

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 23

tcgacttgga ggttgtgcc ttgaggcgtg gct

<210> 24

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 24

acgtcagcca ccattacatc cggtgagcag tca

<210> 25

<211> 22

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 25

gactgctcac cggatgtaat gg